

THERMODYNAMIK DER HAPTEN-ANTIKÖRPER-WECHSELWIRKUNG
AM BEISPIEL VON ÖSTROGEN ANTI-ÖSTROGEN-C6-KONJUGAT
ANTIKÖRPERKOMPLEXEN

Matthias Link

1977

AUS DER I. FRAUENKLINIK DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Direktor: Prof. Dr. med. J. Zander

Thermodynamik der Hapten-Antikörper-Wechselwirkung
am Beispiel von Östrogen Anti-Östrogen-C6-Konjugat
Antikörperkomplexen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München



vorgelegt von
Matthias Link
aus
München

München 1977

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. E. Kuss

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. J. Zander

Dekan: Prof. Dr. med. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 22.11.1977



1. Jan.	Neujahr	1
2. Jan.	Heinrichstag	2
3. Jan.	Epiphaniastag	3
4. Jan.	Heinrichstag	4
5. Jan.	Epiphaniastag	5
6. Jan.	Heinrichstag	6
7. Jan.	Epiphaniastag	7
8. Jan.	Heinrichstag	8
9. Jan.	Epiphaniastag	9
10. Jan.	Heinrichstag	10
11. Jan.	Epiphaniastag	11
12. Jan.	Heinrichstag	12
13. Jan.	Epiphaniastag	13
14. Jan.	Heinrichstag	14
15. Jan.	Epiphaniastag	15
16. Jan.	Heinrichstag	16
17. Jan.	Epiphaniastag	17
18. Jan.	Heinrichstag	18
19. Jan.	Epiphaniastag	19
20. Jan.	Heinrichstag	20
21. Jan.	Epiphaniastag	21
22. Jan.	Heinrichstag	22
23. Jan.	Epiphaniastag	23
24. Jan.	Heinrichstag	24
25. Jan.	Epiphaniastag	25
26. Jan.	Heinrichstag	26
27. Jan.	Epiphaniastag	27
28. Jan.	Heinrichstag	28
29. Jan.	Epiphaniastag	29
30. Jan.	Heinrichstag	30
31. Jan.	Epiphaniastag	31
1. Feb.	Heinrichstag	1
2. Feb.	Epiphaniastag	2
3. Feb.	Heinrichstag	3
4. Feb.	Epiphaniastag	4
5. Feb.	Heinrichstag	5
6. Feb.	Epiphaniastag	6
7. Feb.	Heinrichstag	7
8. Feb.	Epiphaniastag	8
9. Feb.	Heinrichstag	9
10. Feb.	Epiphaniastag	10
11. Feb.	Heinrichstag	11
12. Feb.	Epiphaniastag	12
13. Feb.	Heinrichstag	13
14. Feb.	Epiphaniastag	14
15. Feb.	Heinrichstag	15
16. Feb.	Epiphaniastag	16
17. Feb.	Heinrichstag	17
18. Feb.	Epiphaniastag	18
19. Feb.	Heinrichstag	19
20. Feb.	Epiphaniastag	20
21. Feb.	Heinrichstag	21
22. Feb.	Epiphaniastag	22
23. Feb.	Heinrichstag	23
24. Feb.	Epiphaniastag	24
25. Feb.	Heinrichstag	25
26. Feb.	Epiphaniastag	26
27. Feb.	Heinrichstag	27
28. Feb.	Epiphaniastag	28
29. Feb.	Heinrichstag	29
30. Feb.	Epiphaniastag	30
1. März	Heinrichstag	1
2. März	Epiphaniastag	2
3. März	Heinrichstag	3
4. März	Epiphaniastag	4
5. März	Heinrichstag	5
6. März	Epiphaniastag	6
7. März	Heinrichstag	7
8. März	Epiphaniastag	8
9. März	Heinrichstag	9
10. März	Epiphaniastag	10
11. März	Heinrichstag	11
12. März	Epiphaniastag	12
13. März	Heinrichstag	13
14. März	Epiphaniastag	14
15. März	Heinrichstag	15
16. März	Epiphaniastag	16
17. März	Heinrichstag	17
18. März	Epiphaniastag	18
19. März	Heinrichstag	19
20. März	Epiphaniastag	20
21. März	Heinrichstag	21
22. März	Epiphaniastag	22
23. März	Heinrichstag	23
24. März	Epiphaniastag	24
25. März	Heinrichstag	25
26. März	Epiphaniastag	26
27. März	Heinrichstag	27
28. März	Epiphaniastag	28
29. März	Heinrichstag	29
30. März	Epiphaniastag	30
31. März	Heinrichstag	31
1. April	Epiphaniastag	1
2. April	Heinrichstag	2
3. April	Epiphaniastag	3
4. April	Heinrichstag	4
5. April	Epiphaniastag	5
6. April	Heinrichstag	6
7. April	Epiphaniastag	7
8. April	Heinrichstag	8
9. April	Epiphaniastag	9
10. April	Heinrichstag	10
11. April	Epiphaniastag	11
12. April	Heinrichstag	12
13. April	Epiphaniastag	13
14. April	Heinrichstag	14
15. April	Epiphaniastag	15
16. April	Heinrichstag	16
17. April	Epiphaniastag	17
18. April	Heinrichstag	18
19. April	Epiphaniastag	19
20. April	Heinrichstag	20
21. April	Epiphaniastag	21
22. April	Heinrichstag	22
23. April	Epiphaniastag	23
24. April	Heinrichstag	24
25. April	Epiphaniastag	25
26. April	Heinrichstag	26
27. April	Epiphaniastag	27
28. April	Heinrichstag	28
29. April	Epiphaniastag	29
30. April	Heinrichstag	30
1. Mai	Epiphaniastag	1
2. Mai	Heinrichstag	2
3. Mai	Epiphaniastag	3
4. Mai	Heinrichstag	4
5. Mai	Epiphaniastag	5
6. Mai	Heinrichstag	6
7. Mai	Epiphaniastag	7
8. Mai	Heinrichstag	8
9. Mai	Epiphaniastag	9
10. Mai	Heinrichstag	10
11. Mai	Epiphaniastag	11
12. Mai	Heinrichstag	12
13. Mai	Epiphaniastag	13
14. Mai	Heinrichstag	14
15. Mai	Epiphaniastag	15
16. Mai	Heinrichstag	16
17. Mai	Epiphaniastag	17
18. Mai	Heinrichstag	18
19. Mai	Epiphaniastag	19
20. Mai	Heinrichstag	20
21. Mai	Epiphaniastag	21
22. Mai	Heinrichstag	22
23. Mai	Epiphaniastag	23
24. Mai	Heinrichstag	24
25. Mai	Epiphaniastag	25
26. Mai	Heinrichstag	26
27. Mai	Epiphaniastag	27
28. Mai	Heinrichstag	28
29. Mai	Epiphaniastag	29
30. Mai	Heinrichstag	30
31. Mai	Epiphaniastag	31
1. Juni	Heinrichstag	1
2. Juni	Epiphaniastag	2
3. Juni	Heinrichstag	3
4. Juni	Epiphaniastag	4
5. Juni	Heinrichstag	5
6. Juni	Epiphaniastag	6
7. Juni	Heinrichstag	7
8. Juni	Epiphaniastag	8
9. Juni	Heinrichstag	9
10. Juni	Epiphaniastag	10
11. Juni	Heinrichstag	11
12. Juni	Epiphaniastag	12
13. Juni	Heinrichstag	13
14. Juni	Epiphaniastag	14
15. Juni	Heinrichstag	15
16. Juni	Epiphaniastag	16
17. Juni	Heinrichstag	17
18. Juni	Epiphaniastag	18
19. Juni	Heinrichstag	19
20. Juni	Epiphaniastag	20
21. Juni	Heinrichstag	21
22. Juni	Epiphaniastag	22
23. Juni	Heinrichstag	23
24. Juni	Epiphaniastag	24
25. Juni	Heinrichstag	25
26. Juni	Epiphaniastag	26
27. Juni	Heinrichstag	27
28. Juni	Epiphaniastag	28
29. Juni	Heinrichstag	29
30. Juni	Epiphaniastag	30
1. Juli	Heinrichstag	1
2. Juli	Epiphaniastag	2
3. Juli	Heinrichstag	3
4. Juli	Epiphaniastag	4
5. Juli	Heinrichstag	5
6. Juli	Epiphaniastag	6
7. Juli	Heinrichstag	7
8. Juli	Epiphaniastag	8
9. Juli	Heinrichstag	9
10. Juli	Epiphaniastag	10
11. Juli	Heinrichstag	11
12. Juli	Epiphaniastag	12
13. Juli	Heinrichstag	13
14. Juli	Epiphaniastag	14
15. Juli	Heinrichstag	15
16. Juli	Epiphaniastag	16
17. Juli	Heinrichstag	17
18. Juli	Epiphaniastag	18
19. Juli	Heinrichstag	19
20. Juli	Epiphaniastag	20
21. Juli	Heinrichstag	21
22. Juli	Epiphaniastag	22
23. Juli	Heinrichstag	23
24. Juli	Epiphaniastag	24
25. Juli	Heinrichstag	25
26. Juli	Epiphaniastag	26
27. Juli	Heinrichstag	27
28. Juli	Epiphaniastag	28
29. Juli	Heinrichstag	29
30. Juli	Epiphaniastag	30
31. Juli	Heinrichstag	31
1. August	Epiphaniastag	1
2. August	Heinrichstag	2
3. August	Epiphaniastag	3
4. August	Heinrichstag	4
5. August	Epiphaniastag	5
6. August	Heinrichstag	6
7. August	Epiphaniastag	7
8. August	Heinrichstag	8
9. August	Epiphaniastag	9
10. August	Heinrichstag	10
11. August	Epiphaniastag	11
12. August	Heinrichstag	12
13. August	Epiphaniastag	13
14. August	Heinrichstag	14
15. August	Epiphaniastag	15
16. August	Heinrichstag	16
17. August	Epiphaniastag	17
18. August	Heinrichstag	18
19. August	Epiphaniastag	19
20. August	Heinrichstag	20
21. August	Epiphaniastag	21
22. August	Heinrichstag	22
23. August	Epiphaniastag	23
24. August	Heinrichstag	24
25. August	Epiphaniastag	25
26. August	Heinrichstag	26
27. August	Epiphaniastag	27
28. August	Heinrichstag	28
29. August	Epiphaniastag	29
30. August	Heinrichstag	30
31. August	Epiphaniastag	31
1. September	Heinrichstag	1
2. September	Epiphaniastag	2
3. September	Heinrichstag	3
4. September	Epiphaniastag	4
5. September	Heinrichstag	5
6. September	Epiphaniastag	6
7. September	Heinrichstag	7
8. September	Epiphaniastag	8
9. September	Heinrichstag	9
10. September	Epiphaniastag	10
11. September	Heinrichstag	11
12. September	Epiphaniastag	12
13. September	Heinrichstag	13
14. September	Epiphaniastag	14
15. September	Heinrichstag	15
16. September	Epiphaniastag	16
17. September	Heinrichstag	17
18. September	Epiphaniastag	18
19. September	Heinrichstag	19
20. September	Epiphaniastag	20
21. September	Heinrichstag	21
22. September	Epiphaniastag	22
23. September	Heinrichstag	23
24. September	Epiphaniastag	24
25. September	Heinrichstag	25
26. September	Epiphaniastag	26
27. September	Heinrichstag	27
28. September	Epiphaniastag	28
29. September	Heinrichstag	29
30. September	Epiphaniastag	30
1. Oktober	Heinrichstag	1
2. Oktober	Epiphaniastag	2
3. Oktober	Heinrichstag	3
4. Oktober	Epiphaniastag	4
5. Oktober	Heinrichstag	5
6. Oktober	Epiphaniastag	6
7. Oktober	Heinrichstag	7
8. Oktober	Epiphaniastag	8
9. Oktober	Heinrichstag	9
10. Oktober	Epiphaniastag	10
11. Oktober	Heinrichstag	11
12. Oktober	Epiphaniastag	12
13. Oktober	Heinrichstag	13
14. Oktober	Epiphaniastag	14
15. Oktober	Heinrichstag	15
16. Oktober	Epiphaniastag	16
17. Oktober	Heinrichstag	17
18. Oktober	Epiphaniastag	18
19. Oktober	Heinrichstag	19
20. Oktober	Epiphaniastag	20
21. Oktober	Heinrichstag	21
22. Oktober	Epiphaniastag	22
23. Oktober	Heinrichstag	23
24. Oktober	Epiphaniastag	24
25. Oktober	Heinrichstag	25
26. Oktober	Epiphaniastag	26
27. Oktober	Heinrichstag	27
28. Oktober	Epiphaniastag	28
29. Oktober	Heinrichstag	29
30. Oktober	Epiphaniastag	30
31. Oktober	Heinrichstag	31
1. November	Epiphaniastag	1
2. November	Heinrichstag	2
3. November	Epiphaniastag	3
4. November	Heinrichstag	4
5. November	Epiphaniastag	5
6. November	Heinrichstag	6
7. November	Epiphaniastag	7
8. November	Heinrichstag	8
9. November	Epiphaniastag	9
10. November	Heinrichstag	10
11. November	Epiphaniastag	11
12. November	Heinrichstag	12
13. November	Epiphaniastag	13
14. November	Heinrichstag	14
15. November	Epiphaniastag	15
16. November	Heinrichstag	16
17. November	Epiphaniastag	17
18. November	Heinrichstag	18
19. November	Epiphaniastag	19
20. November	Heinrichstag	20
21. November	Epiphaniastag	21
22. November	Heinrichstag	22
23. November	Epiphaniastag	23
24. November	Heinrichstag	24
25. November	Epiphaniastag	25
26. November	Heinrichstag	26
27. November	Epiphaniastag	27
28. November	Heinrichstag	28
29. November	Epiphaniastag	29
30. November	Heinrichstag	30
1. Dezember	Epiphaniastag	1
2. Dezember	Heinrichstag	2
3. Dezember	Epiphaniastag	3
4. Dezember	Heinrichstag	4
5. Dezember	Epiphaniastag	5
6. Dezember	Heinrichstag	6
7. Dezember	Epiphaniastag	7
8. Dezember	Heinrichstag	8
9. Dezember	Epiphaniastag	9
10. Dezember	Heinrichstag	10
11. Dezember	Epiphaniastag	11
12. Dezember	Heinrichstag	12
13. Dezember	Epiphaniastag	13
14. Dezember	Heinrichstag	14
15. Dezember	Epiphaniastag	15
16. Dezember	Heinrichstag	16
17. Dezember	Epiphaniastag	17
18. Dezember	Heinrichstag	18
19. Dezember	Epiphaniastag	19
20. Dezember	Heinrichstag	20
21. Dezember	Epiphaniastag	21
22. Dezember	Heinrichstag	22
23. Dezember	Epiphaniastag	23
24. Dezember	Heinrichstag	24
25. Dezember	Epiphaniastag	25
26. Dezember	Heinrichstag	26
27. Dezember	Epiphaniastag	27
28. Dezember	Heinrichstag	28
29. Dezember	Epiphaniastag	29
30. Dezember	Heinrichstag	30
31. Dezember	Epiphaniastag	31

Meinen lieben Eltern



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555626_0106

Gliederung

	Seite
Einleitung	1
1. <u>Materialien</u>	3
1.1. Haptene	3
1.2. Antikörper	3
1.3. Reagentien	5
1.4. Geräte	5
1.5. Dialyseapparatur	6
2. <u>Methoden</u>	8
2.1. Gleichgewichtsdialyse: Prinzip	8
2.2. Durchführung	9
2.3. Analytik	10
2.4. Wiederfindung	10
2.5. Präzision	10
2.6. Äquilibrierzeit	11
2.7. Bindungsversuche	11
2.8. Bindungsdaten	11
2.9. Reaktionsenergie, -enthalpie und -entropie.	12
3. <u>Ergebnisse</u>	13
3.1. Äquilibrierzeit	13
3.2. Wiederfindung	13
3.3. Präzision	13
3.4. Bindungsstudien	15
3.5. Tabellen	16, 17, 20 - 26
4. <u>Diskussion</u>	27
4.1. Diskussion der allgemeinen Grundlagen der Bindungsstudien	27
4.1.1. Elementarmodell	27
4.1.1.1. Nichtlineare Darstellung von Bindungs- daten	31

	Seite
a. Michaelis-Menten	31
b. Raynaud-Baulieu	33
c. Klotz	33
4.1.1.2. Lineare Darstellung von Bindungsdaten	33
a. Lineweaver-Burk (Benesi-Hildebrand)	33
b. Eadie-Hofstee (Scott)	33
c. Scatchard	34
d. Eisenthal und Cornish-Bowden	35
4.1.2. Erweitertes Elementarmodell	36
4.1.2.1. Darstellung der Bindungsdaten bei diskreten Klassen von Bindungsenergien	38
4.1.2.2. Darstellung der Bindungsdaten bei symmetrisch verteilten Bindungsenergien	38
4.1.3. Präzision und Zuverlässigkeit der Parameteranpassung	39
4.2. Diskussion der Ergebnisse eigener Bindungsstudien	42
4.2.1. Zuverlässigkeit der Meßwerte	42
4.2.2. Zuverlässigkeit der Parameteranpassung	43
4.2.2.1. Lineare Regression	43
4.2.2.2. Kurvilineare Regression	46
4.2.2.3. Regression nach Eisenthal und Cornish-Bowden	48
4.2.3. Zuverlässigkeit der K- und q-Werte; Homogenität der Antiseren	49
4.2.4. Deutung der eigenen Ergebnisse und Vergleich mit Literaturangaben	51
4.2.4.1. Assoziationskonstanten und Bindungsenergien	51
4.2.4.2. Bindungs-Enthalpie und -Entropie	52
4.2.4.3. Hinweise auf die Art der Hapten-Antikörper-Wechselwirkung	55

5.	<u>Anhang</u>	
5.1.	Bindungsdaten (Anhang 1)	68
a.	Präzision (Anhang 1a, Tab. a - h)	68 - 69
b.	Bindungsstudien (Anhang 1b, Tab. 1 - 27)	70 - 76
5.2.	Scatchard Diagramme mit linearer Regression (Anhang 2)	77
a.	Präzision (Anhang 2a, Abb. a - h)	77 - 80
b.	Bindungsstudien (Anhang 2b, Abb. 1 - 27)	81 - 94
5.3.	Sips-Hill Diagramme mit linearer Regression (Anhang 3, Abb. 1 - 9)	95 - 99
5.4.	Eisenthal und Cornish-Bowden Diagramme (Anhang 4, Abb. 1 - 12)	100 - 105
5.5.	Scatchard Diagramme mit linearer und nichtlinearer Regression (Anhang 5)	106
a.	Newton-Raphson Diagramme (Anhang 5a, Abb. 1 - 18)	106 - 114
b.	Tschebycheff Diagramme (Anhang 5b, Abb. 19 - 25)	115 - 118
5.6.	Van't Hoff Diagramme (Anhang 6, Abb. 1 - 9)	119 - 123

Einleitung

Zahlreiche Makromoleküle besitzen Affinitäten zu niedermolekularen Substanzen und bilden mit ihnen spontan stabile Komplexe (1,2,3). Als Beispiel einer für die praktische und theoretische Medizin gleichermaßen interessanten Wechselwirkung zwischen Makromolekülen und Liganden unterschiedlicher Molekülgröße gilt die Assoziationsreaktion zwischen Antikörpern und Antigenen oder Haptenen. Die Bedeutung der Immunkomplexe sowohl als Ursache der Manifestation von Krankheiten (z.B. Immnhämatolyse, Allergosen) wie auch als Ursache der Resistenz gegen Krankheiten (z.B. Bakterien-Elimination, Toxin-Neutralisation) ist hinreichend bekannt. Darüber hinaus hat die Kenntnis der immunochemischen Wechselwirkungen in den letzten Jahrhunderten auch für die Pharmakologie, Endokrinologie und Klinische Chemie an Bedeutung gewonnen. Sie vertiefte das Verständnis für den Wirkungsmechanismus pharmakologisch oder hormonell aktiver Substanzen und für die Reaktionsbedingungen zur immunochemischen Bestimmung von Bestandteilen biologischer Flüssigkeiten. Die Entwicklung radioimmunologischer Analyseverfahren führte zu einem rapiden Anwachsen unserer Kenntnisse über physiologische Regulationsmechanismen und deren pathologische Veränderungen (4).

Zur Charakterisierung der Wechselwirkungen zwischen Antikörpern und Haptenen werden neben anderen thermodynamischen Größen die Bindungskonstanten herangezogen. Sie determinieren bei variablen Reaktionsbedingungen die Empfindlichkeit und Spezifität immunochemischer Analyseverfahren. Ihre Temperaturabhängigkeit läßt erkennen, ob die Reaktion enthalpie- oder entropiegetrieben abläuft und ob es sinnvoll ist, die Inkubationstemperatur einer immunochemischen Bestimmung zu variieren. Schließlich können auch Informationen darüber erwartet werden, ob hydrophobe Wechselwirkungen, Van der Waals-Kräfte, Ionen- oder Wasserstoffbrückenbindungen den Immunkomplex zusammenhalten. Die thermodynamische Charakterisierung des Bindungsprozesses kann damit einen Einblick in die Natur der Wechselwirkungen zwischen den Reaktionspartnern geben, aus denen sich Hinweise für die Optimierung der Reaktionsbedingungen ableiten lassen (5).

In der vorliegenden Arbeit wird die Bindung der Östrogene Östron, Östradiol-17 β und Östriol an ihre korrespondierenden Antikörper mit Hilfe der Gleichgewichtsdialyse untersucht. Es war das Ziel der Arbeit, die Reaktionsenergie, -enthalpie und -entropie dieser Systeme zu bestimmen und die Zuverlässigkeit der erhaltenen Werte und ihre Bedeutung für radioimmunologische Östrogenbestimmungen zu diskutieren.

1. Materialien

1.1. Haptene

An radioaktiven Substanzen wurde verwendet: 2,4,6,7 $^3\text{H}_4$ -Östron (97 Ci/mmol) und 2,4,6,7 $^3\text{H}_4$ -Östradiol-17 β (90 Ci/mmol) von Radiochemical Centre Ltd., Amersham, Buckinghamshire; 2,4,6,7 $^3\text{H}_4$ -Östriol (112 Ci/mmol) von New England Nuclear; Boston, Mass. Sie wurden bei -18°C in Benzol/Methanol 85:15 aufbewahrt, und vor Gebrauch durch Papierchromatographie (6) auf Reinheit geprüft. Radioaktive Verunreinigungen wurden, soweit vorhanden, durch Säulenchromatographie (Sephadex LH 20, 130 cm, Benzol/Methanol 85/15) auf unter 5 % gebracht (7). Die Arbeitslösungen wurden durch Eindampfen der benötigten Haptenmenge unter Stickstoff und Auflösung des Rückstandes über 24h in wässriger Phosphatpufferlösung (1/15 mol/l, pH 7,2) gewonnen.

1.2. Antikörper

Die Immunogene Östron-, Östradiol-17 β - und Östriol-C6-Carboxymethoxim-Rinderserum-Albumin-Konjugate wurden durch Synthese erhalten (8). Zu der Immunisierung wurden 2 mg Antigen in 0,4 ml Trispuffer (tris(hydroxymethyl)aminomethan, pH 7,5, 5 mM NaN_3) gelöst und zu 0,4 ml Freund's Adjuvant gegeben; 0,2 ml dieser Lösung

wurden Kaninchen beiderlei Geschlechts in jede der vier Pfoten injiziert. Die gleiche Menge wurde drei Wochen später je zweimal subcutan und intramuskulär appliziert. Acht Tage später wurde in gleicher Weise ein zweites Mal geboostert, und eine Woche darauf aus der Ohrvene des Tieres ca. 50 ml Blut entnommen. Nach Gerinnung wurde zentrifugiert; das Serum wurde bei -20° C aufbewahrt. Mit jedem Antigen-Typ waren drei Kaninchen immunisiert worden; entsprechend wurden jeweils drei Anti-Östron- (H,J,K), Anti-Östradiol-17 β - (D,E,F), und Anti-Östriol- (H,J,K) Antiseren erhalten (9).

Aus dem Antiserum wurde die Gamma-Globulin-Fraktion durch Präzipitation mit gleichem Volumen Ammoniumsulfat-Lösung (70 g ad 100 ml, pH 5,8) gewonnen (10). Nach Zentrifugieren wurde der Niederschlag mit destilliertem Wasser aufgenommen, auf das ursprüngliche Volumen aufgefüllt und wieder mit Ammoniumsulfat-Lösung gefällt. Nach der dritten Fällung wurde die in Wasser gelöste Fraktion gegen 0,85 % Kochsalz-Lösung (pH 8,0) dialysiert. Der Gehalt der Lösung an Protein wurde mit der Biuret-Methode, an Östrogen-Bindungsstellen durch Auswertung der Scatchard-Diagramme der Bindungsstudien bestimmt.

1.3. Reagentien

2,5-Diphenyloxazol (PPO), 1,4-bis-2-(4-methyl-5-phenyloxazolyl)-Benzol (POPOP) wurden von Zinsser, Frankfurt, Bio-Solv (BBS3) von Beckman Instruments GmbH, München, und Dextran T 70 mit Sephadex LH 20 von Pharmacia, Uppsala, Schweden bezogen.

Die Phosphatpuffer-Lösung (1/15 mol/l, pH 7,2) enthielt: 2,686 g KH_2PO_4 , 8,356 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,352 g NaN_3 , aqua pro injectione ad 1 l (B. Braun, Melsungen). Szintillationslösung wurde durch Auflösen von 100 g PPO und 1,25 g POPOP in 1 l Toluol und Zugabe von 42 ml dieser Lösung mit 117 ml Bio-Solv zu 1 l Toluol gewonnen. Hiervon wurden 6 ml pro Zählglas für die Flüssigkeitsszintillationszählung verwendet.

1.4. Geräte

Die Gleichgewichtsdialyseapparatur mit Thermostat und Umwälzpumpe für das Wasserbad waren von der Fa. Bachofer, Reutlingen, halbautomatische Pipetten von der Fa. Eppendorf Gerätebau, Hamburg, das Szintillationspektrometer Tricarb 2425 war von der Fa. Packard, Instrument Company Inc., Downers Grove, Ill. bezogen worden.

1.5. Dialyseapparatur

Das Dialysegerät besteht aus vier Zellblöcken mit je fünf Teflonmikrozellen und einer Antriebseinheit, in der die Blöcke befestigt sind. Jede Zelle wird durch eine eingespannte Membran in zwei Hälften unterteilt. Die Zellblöcke rotieren im thermostatisierten Wasserbad um eine zur Membranfläche senkrechte Achse.

Vor Versuchsbeginn wurden die Teflonzellen mit aqua dest. und Methanol gereinigt. Auch die Spectapormembranen aus regenerierter Zellulose (Dicke 20 μm , Porendurchmesser 10 $\text{\AA}$, Ausschlußgrenze MG 6000) wurden vor Verwendung gereinigt, um störende Einflüsse bei der Einstellung des Gleichgewichtes und bei der Analytik zu vermeiden. Dazu wurden sie 15 min. mit aqua dest. im Durchfluß gewaschen, mehrere Stunden in destilliertes Wasser eingelegt, 20 min. im Lösungsmittelsystem des Versuches äquilibriert, und das Lösungsmittel vor dem Einlegen in die Zelle noch einmal erneuert.

Jeder Zellblock wurde zusammengesetzt wie folgt:

Die Antriebswelle wurde mit den Führungsstangen nach oben in den Aufbauring gesetzt und der erste Feder-Press-Adapter eingelegt. Die Membran wurde von überschüssigem Lösungsmittel befreit, auf den Zelldeckel gelegt, und gespannt. Das Gehäuse wurde auf die Mem-

bran gepreßt und die Einfüllbohrungen zur Deckung gebracht. Die fertige Zelle wurde auf den Adapter gesetzt und eingerastet. Der Arbeitsgang wurde für alle fünf Zellen wiederholt und mit dem Aufsetzen der Lagerwelle durch abwechselungsweises Anziehen der Rändelmuttern beendet. Bei den anderen Zellblöcken wurde analog vorgegangen. Die Teflonzellen waren dann zum Füllen mit Dialyselösung bereit. Dazu wurde der Zellblock in eine Füllhalterung eingespannt, die benachbarten Füllbohrungen nach oben gebracht und die Zelhälften mit halbautomatischen Mikropipetten gefüllt. Das Arbeitsvolumen betrug für jede Halbzelle 0,2 ml. Zur Erhöhung der Versuchsgenauigkeit wurde jede Halbzelle statt mit zwei oder drei mit nur einem Pipettierschritt - nach Vorbereitung entsprechender Verdünnungsreihen - gefüllt. Die Bohrungen wurden mit Stopfen verschlossen, die Zellblöcke in der Antriebseinheit befestigt, und das Dialysegerät in ein thermostatisiertes Wasserbad gebracht. Es folgte die Inbetriebnahme nach Einstellung einer Drehzahl von 10 upm. Nach Reaktionsablauf wurde der Zellblock zur Entleerung der Dialysezellen in die Halterung gespannt, die Ausblasbohrungen geöffnet und unter Be-reithaltung eines Glasauffangröhrchens der gegenüberliegende Stopfen geöffnet. Die Dialyselösung wurde dann mit einer leeren Mikropipette ausgeblasen.

Durch die Rotation der Zellen im thermostatisierten Wasserbad kommt eine gute Durchmischung der Lösungen zustande. Das Teflon erlaubt einen schnellen Temperatureausgleich zwischen Dialyselösung und Temperiermedium. Die Einstellung des Diffusionsgleichgewichtes ist von der Membranfläche, -dicke, dem Konzentrationsgradienten und der Temperatur abhängig; sie erfolgt bei niedriger Temperatur langsamer als bei hoher. Eine Adsorption des Dialysegutes an die Innenwand der Teflonzellen ist so gut wie ausgeschlossen, eine geringe Adsorption an die Membran läßt sich jedoch nicht vollständig vermeiden. Die Zellgeometrie und die Membranrotation bewirken, daß die membran nahen Flüssigkeitsschichten durchmischt und gegen das übrige Flüssigkeitsvolumen ausgetauscht werden; dies hat eine ständige Aufrechterhaltung von maximalen Konzentrationsgradienten mit entsprechend kurzen Dialysierzeiten zur Folge.

2. Methoden

2.1. Gleichgewichtsdialyse: Prinzip

Das Prinzip der Gleichgewichtsdialyse beruht darauf, daß niedermolekulare Liganden durch eine semipermeable Membran diffundieren, nicht jedoch hochmolekulare Substanzen.

Nach Einstellung des Diffusionsgleichgewichtes, liegen in den beiden durch die Dialysemembran getrennten Räumen gleiche Konzentrationen an freien Liganden vor. Befindet sich in einem der beiden Räume eine den Liganden bindende hochmolekulare Substanz, so ist hier die totale Ligandenkonzentration um den Anteil des gebundenen Liganden höher als jenseits der Membran.

2.2. Durchführung

Die eine Zelhälfte der Gleichgewichtsdialysezellen wurde nach dem Einsetzen der in Phosphatpuffer (1/15 mol/l, pH 7,2) äquilibrierten Spectapormembran mit 0,2 ml einer Gamma-Globulinlösung bekannter Konzentration (10 µg Protein/Zelle) gefüllt. In die andere Zelhälfte wurden 0,2 ml einer für jede Zelle unterschiedlich konzentrierten Haptenlösung (0,1 - 20 nmol/l) eingegeben. Die Zellen wurden verschlossen, im Dialysegerät befestigt und je nach Versuch bei 15°, 25° oder 35° C im thermostatisierten Wasserbad rotiert.

2.3. Analytik

Nach 120 min. wurde aus jeder Zellohlfte die Dialyse-
Lösung in ein Glasgefäß pipettiert, von jeder dieser
Proben 0,1 ml entnommen, mit 6 ml Szintillationslö-
sung in ein Zählglas gegeben, gemischt, und im Flüssig-
keitsszintillationszähler 10 min. gemessen.

2.4. Wiederfindung

Zur Überprüfung der Wiederfindung wurde die Differenz
zwischen eingesetzter und nach Versuchsablauf aus der
Dialysezelle wiedergefundener Haptenkonzentration
festgestellt und der mittlere Verlust berechnet.

2.5. Präzision

Die Reproduzierbarkeit der Versuchsergebnisse wurde
durch mehrfache Wiederholung der Gleichgewichtsdia-
lyse von radioaktiv markiertem Östriol und korrespon-
dierendem Anti-Östriol-Antikörper K2 (Vers.Nr. 22)
unter gleichgehaltenen Versuchsbedingungen charakte-
risiert.

2.6. Äquilibrierzeit

Die zur Einstellung des Diffusionsgleichgewichtes nötige Zeit wurde in einem Vorversuch bestimmt. Dazu wurden 5 nmol/l radioaktiv markierten Östrons, Östradiols und Östriols gegen Pufferlösung (1/15 mol/l, pH 7,2) dialysiert und der Konzentrationsverlauf in beiden Zellhälften in Abhängigkeit von der Zeit gemessen.

2.7. Bindungsversuche

0,1 - 20 nmol/l der radioaktiv markierten Haptene Östron, Östradiol-17 β und Östriol wurden gegen die Gamma-Globulin-Fractionen der korrespondierenden Anti-Östrogen-C6-Albumin-Konjugat-Antiseren (ca. 10 μ g Protein/Zelle) dialysiert bis sich das Diffusionsgleichgewicht eingestellt hatte. Die Bindungsdaten wurden aus den Reaktionen der drei Liganden mit je drei Antikörpern verschiedener Versuchstiere bei 15 $^{\circ}$, 25 $^{\circ}$ und 35 $^{\circ}$ C gewonnen.

2.8. Bindungsdaten

Die Bindungsdaten wurden nach Scatchard (11), ein Teil nach Sips-Hill (12), Eisenthal und Cornish-Bowden (13), Tschelbycheff (14), Newton-Raphson (15)

aufgetragen (Anhang) und die Bindungsparameter K_{ass} (Gleichgewichtskonstante der Assoziation) und q (Konzentration der Hapten-Bindungsstellen des Antikörpers) mit Hilfe elektronischer Datenverarbeitung berechnet.

2.9. Reaktions-Energie, -Enthalpie und -Entropie

Die Änderung der Gibbs-Energie ΔG wurde aus der Gleichgewichtskonstanten nach folgender Formel berechnet:

$$\Delta G = -RT \cdot \ln K$$

(K = Gleichgewichtskonstante (l/mol), R = allgemeine Gaskonstante = $1,987 \text{ (cal} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1})$, $\ln$ = natürlicher Logarithmus, ΔG in $\text{Kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$)

Die Änderung der Enthalpie ΔH wurde aus der Verschiebung des Reaktionsgleichgewichtes mit der Temperatur nach Van't Hoff bestimmt:

$$R \ln K = \Delta H / T + C$$

(ΔH in $\text{Kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$). Aus einem Diagramm mit $R \ln K$ als Ordinate und T^{-1} als Abszisse ergab sich eine lineare Beziehung mit der Steigung $-\Delta H$.

Die Änderung der Entropie ΔS wurde aus der Gleichung

$$\Delta S = \frac{\Delta H - \Delta G}{T}$$

berechnet. (ΔS in $\text{cal} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$)

3. Ergebnisse

3.1. Äquilibrierzeit

Die Zeit bis zur Einstellung des Diffusionsgleichgewichtes betrug 60 Minuten (Abb. I, S. 14). Bei allen folgenden Versuchen wurde 120 Minuten dialysiert.

3.2. Wiederfindung

Von der eingesetzten Radioaktivität wurden 94 % wiedergefunden, Tab. 1 - 27, Anhang 1b. Der Verlust ist wahrscheinlich auf Membranadsorption zurückzuführen. Um diese Differenz nicht in die Auswertung mit eingehen zu lassen, wurden alle Berechnungen auf wiedergefundenen Mengen bezogen. Die Konzentration an proteingebundenem Hapten wurde aus der Differenz der Haptenkonzentration in beiden Dialysekammern berechnet.

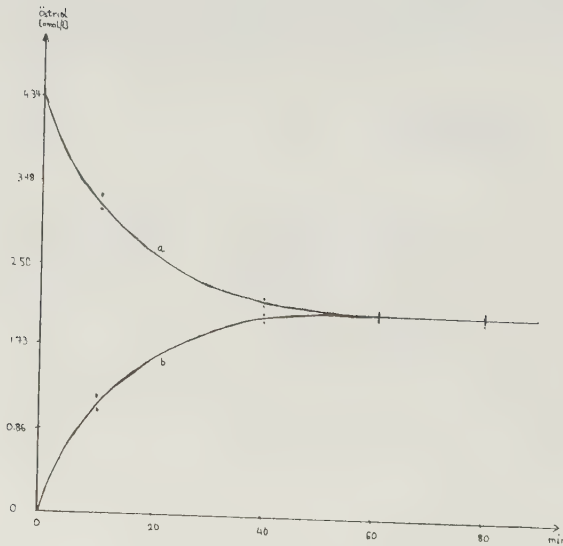
3.3. Präzision

Die Bindungsdaten aus acht wiederholten Gleichgewichtsdialysen sind in Tabelle a-h, Anh. 1a aufgeführt. Für jede Menge des eingesetzten Liganden p_i wurden

Abbildung 1. Zeitabhängigkeit des Konzentrationsausgleiches von $^3\text{H}_4$ -Östriol in Teflonmikrodialysezellen.

a = Haptenkonzentration in der linken -,

b = Haptenkonzentration in der rechten Zelhälfte.



die Mittelwerte und Standardabweichungen von B, F, B/F und T berechnet (Tabelle I); als Variationskoeffizienten wurden Werte zwischen 5 und 10 % errechnet.

Die Ergebnisse der Mehrfachbestimmungen wurden in Scatchard-Diagrammen aufgetragen, Abb. a - h, Anhang 2a.

Aus den Scatchard-Diagrammen wurden je 8 Werte für die Assoziationskonstanten (K) und die Konzentrationen an Hapten-Bindungsstellen (q) ermittelt, die in Tabelle II zusammengefaßt wurden. Aus den Mittelwerten und Standardabweichungen errechneten sich Variationskoeffizienten von etwa 10 % für K und von etwa 3 % für q (Tab. II).

3.4. Bindungsstudien

In Tabelle 1 - 27, Anhang 1b sind die Meßwerte der Gleichgewichtsdialysen von Östron, Östradiol-17 β und Östriol mit je drei ihrer korrespondierenden Antikörper bei 15 $^{\circ}$, 25 $^{\circ}$ und 35 $^{\circ}$ C zusammengefaßt. Aus den Daten wurden die folgenden Diagramme und Berechnungen gewonnen.

1. Für die Scatchard-Diagramme wurden Ausgleichsgeraden durch lineare Regression ermittelt. Die Ergebnisse liegen im Anhang 2b als Computerausdrucke vor

Tabelle I. Gleichgewichtsdialyse. Östriol/Anti-Östriol-Antikörper. Präzision der Bestimmung von gesamtem (T), gebundenem (B) und freien (F) Liganden. Lineare Regressionsanalyse von Scatchard-Diagrammen. $\bar{T}$, $\bar{B}$, $\bar{F}$ = Mittelwerte (nmol/l), s = Standardabweichung, VK = Variationskoeffizient. (N=8)

$\bar{T}$	s	Vk	$\bar{F}$	s	Vk	B/q
0,794	0,112	14,18	0,379	0,074	19,5	0,30
1,675	0,026	1,6	1,032	0,032	3,1	0,47
2,457	0,126	5,1	1,671	0,110	6,6	0,57
3,303	0,074	2,2	2,486	0,343	13,8	0,68
4,134	0,145	3,5	2,896	0,554	11,9	0,70
4,980	0,148	2,9	3,951	0,143	3,6	0,75
5,773	0,294	5,1	4,698	0,310	6,6	0,78
6,691	0,113	1,7	5,557	0,131	2,4	0,83
7,415	0,415	5,6	6,268	0,390	6,2	0,84
8,331	0,175	2,0	7,149	0,189	2,6	0,86
9,173	0,255	2,8	7,944	0,283	3,6	0,90
9,975	0,363	3,6	8,738	0,361	4,1	0,90
10,774	0,279	2,6	9,481	0,294	3,1	0,94
11,783	0,196	1,7	10,477	0,176	1,7	0,95
12,563	0,235	1,9	11,417	0,317	2,8	0,96
$\bar{B}$	s	Vk	$\bar{B}/\bar{F}$	s	Vk	
0,414	0,039	9,4	1,128	0,199	17,7	
0,647	0,014	2,2	0,628	0,028	4,5	
0,786	0,022	2,8	0,471	0,026	5,6	
0,929	0,085	9,1	0,375	0,053	14,1	
0,966	0,030	3,1	0,290	0,036	12,4	
1,029	0,028	2,7	0,261	0,011	4,3	
1,075	0,041	3,8	0,230	0,022	9,7	
1,134	0,042	3,7	0,204	0,011	5,5	
1,147	0,055	4,8	0,183	0,012	6,5	
1,183	0,034	2,9	0,172	0,014	8,2	
1,228	0,039	3,2	0,155	0,010	6,4	
1,237	0,050	4,0	0,142	0,008	5,9	
1,292	0,051	3,9	0,136	0,009	6,8	
1,306	0,047	3,6	0,125	0,004	3,4	
1,311	0,083	6,3	0,115	0,0056	4,9	

Tabelle II. Gleichgewichtsdialyse. Östriol/Anti-Östriol-Antikörper. Präzision der Bestimmung der Gleichgewichtskonstanten K_{ass} und der Konzentration der Antikörper-Bindungsstellen q . Lineare Regressionsanalyse von Scatchard Diagrammen.

s_{yx} = Restvarianz, R = Korrelationskoeffizient,

$\bar{x}$ = Mittelwert, s = Standardabweichung.

Dialyse	K_{ass} ($\cdot 10^9$ l/mol)	q ($\cdot 10^{-9}$ mol/l)	s_{yx}	R
a	0,977	1,358	0,060	0,96
b	0,844	1,431	0,087	0,93
c	0,891	1,347	0,058	0,96
d	0,996	1,338	0,065	0,96
e	0,908	1,411	0,077	0,94
f	0,955	1,322	0,091	0,93
g	0,920	1,394	0,120	0,88
h	1,152	1,357	0,153	0,90

$\bar{K}_{ass} = 0,955;$ $s = 0,0932;$ $V_k = 9,75 \%$.

$\bar{q} = 1,369;$ $s = 0,0380;$ $V_k = 2,77 \%$.

(Abb. 1 - 27). In Tabelle III wurden die ermittelten Werte für die Assoziationskonstanten (K) und für die Konzentrationen der Hapten-Bindungsstellen (q) zusammengefaßt.

2. Für Sips-Diagramme wurden die bei 25⁰ C gewonnenen Meßwerte sowie die aus den Scatchard-Diagrammen errechneten q-Werte herangezogen. Die Ausgleichsgeraden wurden durch lineare Regression ermittelt. Die Ergebnisse liegen im Anhang 3 als Computerausdrucke vor (Abb. 1 - 9). In Tabelle IV wurden die ermittelten Werte für die Assoziationskonstanten (K) und für die Heterogenitätsindices (α) mit den dazugehörigen Vertrauensbereichen zusammengefaßt.

3. Für Eisenthal und Cornish-Bowden Diagramme wurden die bei 25⁰ C gewonnenen Meßwerte der Gleichgewichtsdialysen mit Östron, Östradiol und Östriol herangezogen. Die Ergebnisse liegen im Anhang 4 als Handzeichnungen vor (Abb. 1 - 12). In Tabelle V wurden die ermittelten Werte für die Assoziationskonstanten (K) und für die Konzentrationen der Hapten-Bindungsstellen (q) zusammengefaßt.

4. Die Meßwerte einiger Gleichgewichtsdialysen wurden zusätzlich als nichtlineare Kurvenzüge dargestellt. Die Parameterbestimmung erfolgte in Newton-Raphson- und Tschebycheff-Verfahren. Das Newton-Raphson Verfahren wurde in Anlehnung an Feldmann (15) mit Hilfe

eines Basic-Programmes von Dr. LötZ (München) an der Rechenmaschine Wang 2200 durchgeführt. Die Computerausdrucke wurden im Anhang 5a zusammengestellt (Abb. 1 - 18). Das Tschebycheff-Verfahren wurde von Dr. H.G. Weder (Zürich) an der Rechenmaschine CDC-65000 mit Hilfe eines Algol-Programmes durchgeführt. Diese Ergebnisse finden sich als Computerausdrucke im Anhang 5b (Abb. 19 - 25). Die nach dem Tschebycheff-Verfahren ermittelten Werte für die Assoziationskonstanten (K) und Hapten-Bindungsstellen-Konzentrationen (q) sind in Tabelle VI, die nach dem Newton-Raphson-Verfahren erhaltenen in Tabelle VII zusammengefaßt. In Tabelle VIII sind die nach Scatchard-Sips-Hill und Eisenthal und Cornish-Bowden erhaltenen Ergebnisse zusammengestellt.

5. Die durch lineare Regression der Scatchard-Funktionen gewonnenen Werte für die Assoziationskonstanten bei 15° C, 25° und 35° C wurden im Van't Hoff Diagramm aufgetragen, Anhang 6 (Abb. 1 - 9). Die Ergebnisse für die Änderung der Enthalpie (ΔH) und Entropie (ΔS) wurden in Tabelle IX zusammengefaßt, in die auch die Werte für die Änderung der freien Energie (ΔG) eingetragen wurden.

Tabelle III. Gleichgewichtsdialyse. Bindung von Östrogenen an korrespondierende Anti-Östrogen-Antikörper bei 15°, 25° und 35° C. Lineare Regressionsanalyse von Scatchard Diagrammen. K = Gleichgewichtskonstanten der Assoziation, q = Konzentration der Antikörperbindungsstellen, s_{yx} = Restvarianz, R = Korrelationskoeffizient, B = Konzentration y^x des gebundenen Liganden.

Nr	Ak	Temp. °C	K (10^9 l/mol)	q (10^9 mol/l)	s_{yx}	R	(B/q) min.	(B/q) max.
<i>Östron</i>								
1	H2	15	0,832	4,331	0,404	0,931	0,106	1,009
2	H2	25	0,420	4,170	0,158	0,933	0,111	0,959
3	H2	35	0,231	4,450	0,048	0,980	0,068	0,736
4	J2	15	1,533	5,638	1,724	0,825	0,123	1,034
5	J2	25	0,795	5,213	0,234	0,976	0,145	0,941
6	J2	35	0,624	4,816	0,465	0,878	0,111	1,001
7	K2	15	0,707	6,900	0,285	0,971	0,163	0,964
8	K2	25	0,138	7,746	0,054	0,962	0,089	0,709
9	K2	35	0,095	7,382	0,031	0,959	0,072	0,576
<i>Östradiol-17β</i>								
10	D2	15	5,772	0,542	0,191	0,963	0,217	0,946
11	D2	25	3,929	0,538	0,117	0,966	0,256	0,905
12	D2	35	2,088	0,511	0,043	0,969	0,215	0,808
13	E2	15	3,723	0,859	0,701	0,858	0,090	1,131
14	E2	25	1,703	0,764	0,101	0,961	0,155	0,962
15	E2	35	0,500	1,058	0,036	0,961	0,129	0,850
15	F2	15	0,668	2,958	0,141	0,948	0,192	0,930
17	F2	25	0,297	3,026	0,042	0,971	0,136	0,794
18	F2	35	0,199	2,954	0,016	0,988	0,108	0,689
<i>Östriol</i>								
19	J2	15	1,151	1,942	0,161	0,967	0,125	1,001
20	J2	25	0,773	1,631	0,117	0,948	0,127	1,005
21	J2	35	0,218	1,568	0,012	0,980	0,077	0,663
22	K2	15	0,972	1,350	0,059	0,970	0,314	0,962
23	K2	25	0,768	1,119	0,058	0,938	0,309	1,027
24	K2	35	0,284	1,257	0,004	0,997	0,151	0,759
25	H2	15	1,068	1,191	0,135	0,927	0,196	1,063
26	H2	25	0,435	1,266	0,015	0,992	0,164	0,835
27	H2	35	0,281	1,185	0,011	0,988	0,109	0,820

Tabelle IV. Gleichgewichtsdialyse. Bindung von Östrogenen an korrespondierende Anti-Östrogen-Antikörper bei 25° C. Lineare Regressionsanalyse von Sips-Diagrammen. q aus Tabelle II. K = Gleichgewichtskonstante der Assoziation, α = Heterogenitätskoeffizient, Vb = Vertrauensbereich, s_{yx} = Restvarianz, R = Korrelationskoeffizient. a: Auswertung aller Daten eines Versuches, b: Auswertung nur derjenigen Daten mit $B/q \leq 0,8$.

Nr.	Ak.	K (10^9 l/mol)	Vb	α	Vb	s_{yx}	R
<u>Östron</u>							
2(a)	H2	0,483	0,315-0,660	1,217	1,026-1,407	0,398	0,97
2(b)	H2	0,414	0,335-0,494	0,993	0,901-1,086	0,138	0,99
5(a)	J2	0,796	0,668-0,922	1,080	0,989-1,171	0,197	0,99
5(b)	J2	0,752	0,643-0,854	0,949	0,851-1,056	0,118	0,99
8(a,b)	K2	0,134	0,104-0,168	0,976	0,913-1,040	0,081	0,99
<u>Östradiol-17β</u>							
11(a)	D2	3,842	3,923-1,601	1,058	0,952-1,165	0,178	0,98
11(b)	D2	3,721	3,199-3,754	0,926	0,829-1,023	0,109	0,99
14(a)	E2	1,838	1,471-2,110	1,282	0,979-1,585	0,691	0,93
14(b)	E2	1,459	1,373-1,541	0,846	0,788-0,903	0,076	0,99
17(a,b)	F2	0,289	0,232-0,349	0,971	0,897-1,045	0,094	0,99
<u>Östriol</u>							
20(a)	J2	0,803	0,629-0,971	1,090	0,952-1,228	0,281	0,98
20(b)	J2	0,685	0,581-0,782	0,904	0,812-0,995	0,113	0,99
23(a)	K2	0,739	0,604-0,873	1,019	0,924-1,111	0,141	0,98
23(b)	K2	0,753	0,601-0,895	0,886	0,767-1,006	0,107	0,99
26(a)	H2	0,444	0,371-0,518	1,034	0,962-1,105	0,122	0,99
26(b)	H2	0,426	0,402-0,450	0,961	0,935-0,987	0,031	0,99

Tabelle V. Gleichgewichtsdialyse. Bindung von Östrogen an korrespondierende Anti-Östrogen-Antikörper bei 25° C. Auswertung der Bindungsdaten nach Eisenthal und Cornish-Bowden. K = Gleichgewichtskonstanten der Assoziation, q = Konzentrationen der Antikörperbindungsstellen.

Nr.	Ak.	$(10^9 \text{ K} \text{ l/mol})$	$(10^{-9} \text{ q mol/l})$
-----	-----	----------------------------------	-----------------------------

Östron

2	H2	0,303	4,70
5	J2	0,666	5,37
8	K2	0,128	8,02

Östradiol-17β

11	D2	3,816	0,561
14	E2	2,50	0,705
17	F2	0,284	2,88

Östriol

20	J2	0,606	1,82
23	K2	0,71	1,187
26	H2	0,512	1,194

Tabelle VI. Gleichgewichtsdialyse. Bindung von Östrogenen an korrespondierende Anti-Östrogen Antikörper bei 15°, 25° und 35° C. Auswertung durch Parameteranpassung nach Tschelbycheff. $K_{1,2}$ = Gleichgewichtskonstanten der Assoziation, $q_{1,2}$ = Konzentrationen der Antikörperbindungsstellen.

Nr.	Ak.	Temp. °C	K_1 (10^9 l/mol)	q_1 (10^{-9} mol/l)	K_2 (10^{-9} mol/l)	q_2	K_1 (Normale Optimierung)	q_1	K_2	q_2
<u>Östron</u>										
2	H2	25	0,008	33,18	1,439	1,44	0,005	32,74	1,05	1,892
6	J2	35	0,006	40,74	2,124	2,03	0,01	41,18	2,75	1,599
<u>Östradiol-17ß</u>										
11	D2	25	0,404	4,20	9,173	0,302	0,044	4,21	9,89	0,285
12	D2	35	0,041	3,60	4,594	0,255	0,044	3,61	0,829	0,243
13	E2	15	0,442	0,90	23,82	0,237	0,624	0,80	23,84	0,223
<u>Östriol</u>										
20	J2	25	0,150	1,93	3,585	0,456	0,068	2,77	2,525	0,618
25	H2	15	0,196	1,28	6,052	0,360	0,129	1,502	4,690	0,428

Tab. VII. Gleichgewichtsdialyse. Bindung von Östrogenen an korrespondierende Anti-Östrogen-Antikörper. Auswertung durch Parameteranpassung nach Newton-Raphson. $K_{1,2}$ = Gleichgewichtskonstanten der Assoziation, $q_{1,2}$ = Konzentrationen der Antikörperbindungsstellen. S = Summe der Fehlerquadrate.

Nr.	Ak.	Temp. °C	K_1 (10^9 l/mol)	K_2	q_1 (10^{-9} mol/l)	q_2	S
<u>Östradiol-17β</u>							
13	E2	15	$0,8 \pm 0,7$	30 ± 9	$0,8 \pm 0,4$	$0,2 \pm 0,05$	0,07
14	E2	25	$0,76 \pm 0,5$	$7,4 \pm 5$	$0,6 \pm 0,09$	$0,2 \pm 0,1$	0,001
<u>Östriol</u>							
25	H2	15	$0,44 \pm 0,1$	$35,4 \pm 0,7$	$1,2 \pm 0,1$	$0,2 \pm 0,07$	0,0007

Tab. VIII. Gleichgewichtsdialyse. Bindung von Östrogenen an korrespondierende Anti-Östrogen-Antikörper bei 25° C. Vergleich der nach Scatchard, Sips-Hill, und Eisenthal und Cornish-Bowden erhaltenen Ergebnisse. K = Gleichgewichtskonstanten der Assoziation, q = Konzentrationen der Antikörperbindungsstellen.

Nr. Ak.	Scatchard		Eisenthal, C.B.		Eisenthal u. Cornish-Bowden	
	$\frac{K}{(10^9 \text{ L/mol})}$		Sips-Hill	Scatchard		
<u>Östron</u>						
2 H2	0,42	0,41	0,30	4,17	4,70	
5 J2	0,80	0,79	0,67	5,21	5,37	
8 K2	0,14	0,13	0,13	7,74	8,02	
<u>Östradiol-17β</u>						
11 D2	3,93	3,7	3,82	0,54	0,56	
14 E2	1,70	1,5	2,50	0,76	0,70	
17 F2	0,30	0,29	0,28	3,02	2,88	
<u>Östriol</u>						
20 J2	0,77	0,69	0,61	1,63	1,82	
23 K2	0,77	0,74	0,71	1,12	1,18	
26 H2	0,44	0,44	0,51	1,26	1,19	

Tabelle IX. Gleichgewichtsdialyse. Bindung von Östrogenen an korrespondierende Anti-Östrogen-Antikörper bei 15°, 25° und 35° C. Änderung der freien Energie ΔG , Enthalpie ΔH und Entropie ΔS . Auswertung nach Van't Hoff Diagrammen. s_{yx} = Restvarianz, R = Korrelationskoeffizient.

Nr.	Ak.	ΔG (kcal/mol; 25°C)	ΔH (kcal/mol)	ΔS (cal/mol · Grad)	s_{yx}	R
<u>Östron</u>						
1, 2, 3	H2	-13,7	-10,9	9,2	1,9	0,97
4, 5, 6	J2	-14,1	- 7,7	21,3	0,1	0,97
7, 8, 9	K2	-13,0	-17,3	-14,1	0,5	0,94
<u>Östradiol-17β</u>						
10, 11, 12	D2	-15,0	- 8,6	21,2	0,1	0,98
13, 14, 15	E2	-14,5	-17,1	- 8,8	0,2	0,98
16, 17, 18	F2	-13,5	-10,4	10,6	0,1	0,98
<u>Östriol</u>						
19, 20, 21	J2	-14,0	-13,8	8,1	0,4	0,95
22, 23, 24	K2	-14,0	- 7,7	21,3	0,2	0,95
25, 26, 27	H2	-13,7	-11,4	7,5	0,1	0,98

4. Diskussion

4.1. Diskussion der allgemeinen Grundlagen der Bindungsstudien

4.1.1. Elementarmodell

Das Elementarmodell der Protein-Ligand-Wechselwirkung geht von homogenen und univalenten Reaktionspartnern aus. Die Bindungsreaktion wird durch die Geschwindigkeitskonstanten der Assoziation k_1 und der Dissoziation k_2 und durch deren Quotienten, der Gleichgewichtskonstanten K beschrieben. Es gilt:

$(P) = F$: Molare Konzentration des freien, nicht gebundenen Liganden (Hapten).

$(Q) =$ Molare Konzentration des freien, nicht gebundenen Proteins (Antikörper).

$(PQ) = B$: Molare Konzentration des Protein-Ligand-Komplexes.

$p = (PQ) + (P) = B + F$: Totale Ligandenkonzentration.

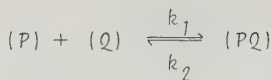
$q = (PQ) + (Q) = B + Q$: Totale Antikörperkonzentration.

$K = k_1/k_2$: Gleichgewichtskonstante der Assoziation.

$\alpha =$ Heterogenitätskoeffizient.

Für die nachfolgenden Gleichungen (S. 28, 29) gilt:

Aus dem Massenwirkungsgesetz (1a) leitet sich Gleichung 2a ab. Dies ist die Sättigungsgleichung nach Michaelis-Menten (16), die allgemeine Form davon ist



$$1a \quad K = \frac{k_1}{k_2} = \frac{(PQ)}{(P) \cdot (Q)}$$

$$p = (PQ) + (P)$$

$$q = (PQ) + (Q)$$

$$h = \frac{(PQ)}{q}$$

$$1b \quad K = \frac{B}{F(q - B)}$$

$$1c \quad KF^{\infty} = \frac{B}{q - B} ; \quad \alpha = 1 :$$

$$KF = \frac{B}{(Q)}$$

$$KF(Q) = B$$

$$\frac{KF(Q)}{(Q) + (PQ)} = \frac{B}{q}$$

$$KF \frac{1}{1 + \frac{(PQ)}{q}} = \frac{B}{q}$$

$$2a \quad \frac{B}{q} = \frac{KF}{1 + KF}$$

$$2b \quad \theta = \frac{KP}{1 + KP}$$

$$2a \quad B = \frac{KF}{1 + KF} \cdot q$$

$$B = \frac{qK}{\frac{1}{F} + K}$$

$$\frac{1}{B} = \left(\frac{1}{F} + K\right) \frac{1}{Kq}$$

$$\frac{1}{B} = \frac{1}{qKF} + \frac{K}{qK}$$

$$3 \quad \frac{F}{B} = \frac{1}{qK} + \frac{1}{q} \cdot F$$

$$2a \quad B = \frac{KF}{1 + KF} \cdot q$$

$$B = \frac{q}{\frac{1}{KF} + 1}$$

$$\frac{1}{B} = \left(\frac{1}{KF} + 1 \right) \frac{1}{q}$$

$$4 \quad \frac{1}{B} = \frac{1}{q} + \frac{1}{Kq} \cdot \frac{1}{F}$$

$$2a \quad B = \frac{KF}{1 + KF} q$$

$$B = \frac{qK}{\frac{1}{F} + K}$$

$$B \left(\frac{1}{F} + K \right) = qK$$

$$\frac{B}{F} + KB = qK$$

$$5 \quad \frac{B}{F} = Kq - KB$$

$$2a \quad B = \frac{KF}{1 + KF} q = \frac{qF}{\frac{1}{K} + F}$$

$$\frac{B}{q} = \frac{F}{\frac{1}{K} + F}$$

$$\frac{B}{q} = \frac{1}{\frac{1}{KF} + 1}$$

$$\frac{q}{B} = \frac{1}{KF} + 1$$

$$6 \quad \frac{q}{B} - \frac{1}{F} = 1$$

$$1c \quad KF^{\infty} = \frac{B}{q - B}; \quad \alpha \neq 1 :$$

$$7 \quad \log_{\frac{B}{q - B}} = \log K + \log F$$

$$8 \quad \log_{\frac{B}{q}} (\text{lin.}) = \log KF$$

$$9 \quad \log \frac{B}{p} - \log \frac{F}{p} = \log Kq$$

Gl. 2b, die Langmuirsche Adsorptionsisotherme, welche die Adsorption von Gasen an der Oberfläche eines Adsorbenden beschreibt (17). (θ = Bedeckungsgrad, p = Druck des Sorbenden). Aus Gl 2a wurden abgeleitet: Gl. 3 = Eadie-Hofstee (18), Gl. 4 = Lineweaver-Burk (19), Gl.5 = Scatchard (11), Gl.6 = Eisenthal und Cornish-Bowden (13). Gl.7 = Sips-Hill (12) folgte aus Gl.1c. Gl.8 = Klotz (20). Gl.9 = Baulieu-Raynaud (21).

Bei Bindungsexperimenten werden häufig bekannte variable Mengen des Liganden ($p_1, p_2, \dots p_n$) und unbekannte, konstante Mengen des Binders ($q_1, q_2, \dots q_m$) eingesetzt. Die Gleichgewichtskonzentrationen des freien (P) und des gebundenen Liganden (PQ) sind relativ leicht zu bestimmen. $p = (P) + (PQ)$. Die Summe der Gleichgewichtskonzentrationen des Binders setzt sich zusammen aus (Q) und (PQ); $q = (PQ) + (Q)$. Da die Größen zueinander und mit der Assoziationskonstanten K_{ass} über das Massenwirkungsgesetz in Beziehung stehen (Gl.1-9), lassen sich durch eine Serie von (P) und (PQ)-Bestimmungen bei konstanten q und variablen p die interessierenden Parameter q und K_{ass} bestimmen. Die Problemstellung entspricht der Bestimmung der Maximalgeschwindigkeit und der Michaeliskonstanten in der Enzymologie.

Der Definitionsgleichung $K = \frac{B}{(q - B)F}$ kann zu nicht-linearen und linearen Beziehungen $(P) = F$ und $(PQ) = B$

umgeformt werden, aus denen sich die unbekannten Parameter K und q graphisch oder numerisch ermitteln lassen. Die graphischen Lösungen der nichtlinearen Funktionen sind wegen den Schwierigkeiten bei exakten Kurvenzeichnungen und Asymptoten-Konstruktionen unscharf. Die numerischen Lösungen erfordern aufwendig programmierte elektronische Datenverarbeitung zur nichtlinearen Regression.

Die graphische Lösung der linearen Beziehungen scheint einfach zu sein, da nur eine Gerade zu ziehen ist, die möglichst nahe an allen Meßpunkten vorbeiführt. Auch die numerische Lösung der Funktion über die Methode der kleinsten Fehlerquadrate erscheint einfach. Die Richtigkeit dieser Technik ist jedoch problematisch, weil Fehlerfreiheit der unabhängigen Variablen, Gleichwertigkeit aller Meßwerte und Gleichverteilung der Varianz über die gesamte Gerade (Homoskedastizität) vorausgesetzt werden.

4.1.1.1. Nichtlineare Darstellung von Bindungsdaten

a. Michaelis-Menten (B vs. F)

Im Michaelis-Menten Diagramm (16), dessen Kurvenzug der Adsorptionsisothermen von Langmuir entspricht (22), wird aus den Bindungsdaten eine Hyperbel erstellt, die sich bei hohen Werten von F asymptotisch

dem Wert $B = q$, dem Sättigungswert, nähert. Aus dieser Größe kann auf die Halbsättigung, $B = q/2$ geschlossen werden; der F-Wert dieses Punktes ist identisch mit $1/K$ wie aus der Gleichung 2a ersichtlich. Diese Charakteristika des Kurvenzuges werden zur Bestimmung von q und K herangezogen.

Die Vorteile des Michaelis-Menten Diagrammes liegen in der unmittelbar einsichtigen Darstellung des Sättigungsverhaltens des Bindungsproteins, in der vollständigen Trennung der beiden Variablen B und F und in der Tatsache, daß keine Transformation der Meßwerte und damit auch keine Veränderung ihrer Varianz erfolgt.

In der Praxis treten häufig Schwierigkeiten auf, weil der Sättigungswert nicht ohne Willkür festgelegt werden kann, insbesondere wenn bei hohen Ligandenkonzentrationen unspezifische Bindungen an Bedeutung gewinnen. Daneben ist eine fehlerhafte Bestimmung von K besonders dann möglich, wenn bei der graphischen Auswertung nur ein einziger Punkt der Kurve und nicht sämtliche Bindungsdaten des Kurvenzuges zur Bestimmung von $q/2$ herangezogen wird. Für die Anpassung des Michaelis-Menten Kurvenzuges an die Meßdaten sind Computer-Programme eingesetzt worden [23].

Ein Nachteil des Michaelis-Menten Diagrammes liegt darin, daß es nicht geeignet ist, Abweichungen des untersuchten Bindungssystems vom Elementarmodell erkennen

bar werden zu lassen.

b. Baulieu-Raynaud ($\log B/p$ vs. $\log p$)

c. Klotz ($\log B/q$ vs. $\log F$)

Der besondere Vorteil der logarithmischen Darstellungen von Bindungsdaten nach Baulieu-Raynaud (21) oder nach Klotz (24) liegt in der Möglichkeit, Meßdaten, die sich über einen weiten Konzentrationsbereich erstrecken, als gleichmäßig verteilte Punkte in einem Diagramm zur Darstellung zu bringen. Die letztgenannte Möglichkeit bietet zwar den Vorteil, daß keine Verzerrung der Funktion stattfindet, setzt jedoch die genaue Kenntnis der Antikörperkonzentration q voraus. Für die Auswertung der logarithmischen Darstellungen werden spezielle Computerprogramme benötigt, so daß eine allgemeine Verbreitung eingeschränkt ist und bisher nur wenig Erfahrungen vorliegen.

4.1.1.2. Lineare Darstellung von Bindungsdaten

a. Lineweaver-Burk (Benesi-Hildebrand) ($1/B$ vs. $1/F$)

b. Eadie-Hofstee (Scott) (F/B vs. F)

Die Linearisierung von Bindungsdaten wird zunehmend kritisiert (24,25). Lineweaver-Burk (19) und Eadie-

Hofstee-Diagramme (18) besitzen keine Begrenzung für hohe Abszissenwerte. Das führt dazu, daß in irgendeinem Bereich gemessen und durch Extrapolation eine Gerade erzielt werden kann, auch wenn das gemessene System nicht dem Elementarmodell entspricht. Hinzu kommt, daß besonders in der Lineweaver-Burk-Darstellung die Abszissen-Inkremente ungleichmäßig verteilt sind und sich zum Nullpunkt hin stauen. Die Folge davon ist, daß die mit hoher Ungenauigkeit behafteten Werte für niedrige Liganden-Konzentrationen starken Einfluß auf die lineare Regression gewinnen (24).

c. Scatchard (B/F vs. B)

Im Scatchard-Diagramm (11) wird q als Abszissen-Abschnitt und $-K$ als Anstieg der Geraden erhalten. Es gilt als vorteilhaft, daß auf dem Abszissenabschnitt von $B/q = 0$ bis $B/q = 1$ die Sättigungsfractionen äquidistant und vollständig dargestellt und die Fehler in K symmetrisch zum Nullpunkt angeordnet sind. Die Darstellung nach Scatchard gilt deswegen als Methode der Wahl zur linearen Darstellung von Bindungsdaten, weil Abweichungen vom Elementarmodell deutlich als Abweichung der Meßpunkte von einer Geraden zu erkennen sind (25).

d. Eisenthal und Cornish-Bowden (q vs. $1/K$)

In der Form $B = \frac{qF}{1/K + F}$ stellt die Michaelis-Menten Gleichung eine Hyperbel dar, die durch den Nullpunkt verläuft und durch die Asymptoten $F = -1/K$ und $B = q$ charakterisiert ist. Die Asymptoten können grundsätzlich nicht hinreichend präzise dargestellt werden, da aus physikalischen Gründen B nur für endliche positive Werte von F bestimmt werden kann.

In der direkten linearen Darstellung der Michaelis-Menten Gleichung von Eisenthal und Cornish-Bowden (13,22) werden als Koordinaten nicht die Variablen B und F verwendet, sondern die Parameter q und $1/K$. Schreibt man die Michaelis-Menten Gleichung in der Form $q/B - 1/K/F = 1$ (Gl.6 S. 29), dann ist zu erkennen, daß ein Punkt des B vs. F - Raumes im q vs. $1/K$ -Raum durch eine Gerade mit den Abschnitten B auf der q -Achse und F auf der $1/K$ -Achse repräsentiert wird. Diese Gerade führt durch alle Punkte des q vs. $1/K$ -Raumes, die dem beobachteten Wertepaar B, F als $q, 1/K$ -Parameter der Michaelis-Menten Gleichung genügen. Hieraus folgt, daß nur der Schnittpunkt der Geraden von zwei oder mehreren Wertepaaren im q vs. $1/K$ -Raum den q - und $1/K$ -Wert des beobachteten Systems definiert. Da die B - und F -Messungen in der Praxis nicht fehlerfrei sind, können maximal bei n Werte-

paaren $1/2 \cdot n \cdot (n - 1)$ Schnittpunkte auftreten.

Die beiden Medianwerte der Koordinaten q und $1/K$ der Schnittpunkte charakterisieren das beobachtete System. Der Vorteil dieser parameterfreien Bestimmung von q und K liegt darin, daß über die statistische Verteilung der Meßfehler keine Voraussetzungen gemacht werden müssen, daß der Medianwert unempfindlich gegen Ausreißer ist und daß wenige B, F-Wertepaare genügen, um ohne mathematischen Aufwand q und K zu bestimmen.

Über die Eignung des Eisenthal-Cornish-Bowden-Diagrammes zur Charakterisierung von Hapten-Antikörper-Bindungsreaktionen liegen in der Literatur noch keine Erfahrungen vor.

4.1.2. Erweitertes Elementarmodell

In erweiterten Elementarmodellen der Protein-Ligand-Wechselwirkung werden folgende Möglichkeiten berücksichtigt:

- a. Die Bindungsreaktionen sind nicht voneinander unabhängig. Es besteht negative oder positive Kooperativität.
- b. Die Haptene sind nicht einheitlich, sondern setzen sich aus Substanzen p_i ($i = 1, 2, \dots, N$) zusammen, die "kreuzreagieren", d.h. Affinitäten zum bindenden Makromolekül aufweisen.

c. Die bindenden Makromoleküle sind nicht einheitlich, sondern setzen sich aus Mengen von Antikörpermolekülen q_j ($j = 1, 2, \dots, M$) mit unterschiedlichen Bindungsenergien zusammen.

Da die Haptenbindung durch Antikörper offenbar ohne kooperativen Effekt verläuft (26) und da unter den hier beschriebenen Versuchsbedingungen nur einheitliche Haptene eingesetzt werden, wird im folgenden nur die unter c. genannte Erweiterung des Elementarmodells berücksichtigt.

Die bindenden Makromoleküle können aus diskreten Klassen unterschiedlicher Antikörpermengen mit unterschiedlichen Bindungsenergien bestehen oder aus Antikörperspezies, deren Bindungsenergien sich in einer annähernd Gauss'schen Verteilung darstellen lassen. In beiden Fällen werden die Meßwerte im Scatchard-Diagramm nicht auf einer Geraden sondern auf einer Hyperbel liegen, die als Superposition der Scatchard-Geraden der einzelnen Antikörper-Klassen aufgefaßt und entsprechend analysiert werden kann.

Bei einer annähernd Gauss'schen Verteilung der Bindungsenergien ist zusätzlich eine Charakterisierung der Heterogenität der Antikörperpopulation mit Hilfe der Sips-Funktion möglich.

4.1.2.1. Darstellung der Bindungsdaten bei diskreten Klassen von Bindungsenergien (Scatchard, B/F vs. B)

Bei zwei Klassen von bindenden Antikörpern ist eine graphische Lösung der Hyperbelfunktion möglich (27). Bei multiplen unabhängigen Klassen von Bindungsstellen können nach Klotz (28) die limitierenden Neigungen und deren Koordinatenschnittpunkte aus den nicht-linearen graphischen Darstellungen bestimmt werden. Für die Parameteranpassung dieser Modelle werden numerische Iterationsverfahren empfohlen (15). Bezeichnet man beim Vorliegen von zwei und mehr unabhängigen Klassen von Bindungsstellen die Anzahl der Klassen mit M , und geht davon aus, daß jede Klasse, i , q_i Bindungsstellen mit der jeweiligen Bindungskonstante K_i hat, so nimmt Gleichung 2a (S. 28) die allgemeine Form an:

$$\frac{B}{F} = \frac{K_1}{1 + K_1 F} \cdot q_1 + \frac{K_2}{1 + K_2 F} \cdot q_2 + \dots + \frac{K_M}{1 + K_M F} \cdot q_M = \sum_{i=1}^M \frac{q_i K_i}{1 + K_i F}$$

4.1.2.2. Darstellung der Bindungsdaten bei symmetrisch verteilten Bindungsenergien (Sips $\log \frac{B}{q-B}$ vs. $\log F$)

Bei einer einheitlichen Population bindender Makro-

moleküle wird eine Gerade mit dem Anstieg $\alpha = 1$ und mit einem Abszissenabschnitt $-\log K$ erwartet. Bei einer heterogenen Population bindender Makromoleküle mit symmetrisch verteilten Bindungsenergien ist der Regressionskoeffizient (Heterogenitätsindex) α von 1 verschieden; je breiter die Bindungsenergien verteilt sind, um so kleiner wird α (29,30).

Bei heterogenen Populationen bindender Makromoleküle mit nicht symmetrisch verteilten Bindungsenergien sind Abweichungen der Meßwerte von der Sips-Geraden zu erwarten.

4.1.3. Präzision und Zuverlässigkeit der Parameteranpassung

Die Präzision der Bestimmung von K und q ist u.a. von der Verteilung und der Anzahl der Meßdaten abhängig. Messungen bei B/q unter 0,2 ergeben große Fehler für K und q , bei B/q über 0,8 ergeben sich zwar präzise Werte für q , jedoch eine ansteigende Ungenauigkeit der K -Bestimmung (31). Im Bereich $0,2 \leq B/q \leq 0,8$ sind die präzisesten Daten für K und q zu erwarten. Zur eindeutigen Charakterisierung des Kurvenverlaufes ist die größtmögliche Anzahl an Meßpunkten in diesem Bereich anzustreben. Dies findet jedoch dadurch eine Grenze, daß alle Meßpunkte, deren Abstände unterhalb

der doppelten Standardabweichung für B liegen die gleiche Information bringen.

Die Bindungsversuche sind so einzurichten, daß das Verhältnis von K/q bei etwa 1 liegt; dadurch wird auch der Quotient B/F nahe 1 liegen. Dies läßt sich zuverlässiger bestimmen, als ein Verhältnis von etwa 0,001 oder 1000. Da bei Antikörper-Untersuchungen mit einem K von etwa 10^9 l/mol zu rechnen ist, muß ein q von etwa 10^{-9} mol/l eingesetzt werden.

Die Bestimmung der Parameter eines Bindungssystems kann mit graphischen oder numerischen Methoden der Parameter-Anpassung erfolgen. Die graphischen Methoden der Parameterbestimmung (27) gehen von der Tatsache aus, daß die Steigung der äußeren Enden des Scatchard-Diagrammes sehr wenig von anderen Bindungsstellpopulationen des Antikörpers beeinflußt werden (14). Als eine graphische Methode wird vorgeschlagen (32) die Asymptoten des Scatchard-Diagrammes vor dem Ablesen der q -Werte auf der Abszisse derart zu verschieben, daß die Summe der Ordinatenschnittpunkte gleich dem Ordinatenschnittpunkt der experimentellen Bindungskurve wird.

Bei Anwendung numerischer Methoden sollte bei der Parameter-Anpassung folgendes beachtet werden (33):

a. Es kann ein allgemeines oder speziell für Hapten-Antikörperreaktionen aufgestelltes Programm für die

Anpassung nichtlinearer Bindungskurven verwendet werden. Die einfache ungewichtete lineare Regression, angewendet auf die linearisierten Formen der Bindungsgleichung ist bei ungleicher Varianzverteilung und bei einer Fehlerkorrelation von abhängiger und unabhängiger Variablen problematisch. Sie sollte nur auf direkt gemessene Variable angewendet werden.

b. Die direkt gemessenen Größen sollten in einer oder mehreren linearisierten Formen aufgetragen werden und die Qualität der Parameter-Anpassung graphisch und statistisch bewertet werden.

c. Die unabhängige Variable sollte fehlerfrei sein;

d. Für die Parameter sollten Konfidenzintervalle aufgestellt werden.

Bei einer numerischen Methode, der Tschebycheff-Parameter-Anpassung nach Weder et al (14), wird entlang der experimentellen Bindungskurve des Scatchard-Diagrammes ein Band gelegt, innerhalb dessen sich alle Meßpunkte befinden. Mit einem Computerprogramm wird die Bandbreite radial und senkrecht minimiert, und die radial und normal optimierte Bindungskurve erhalten.

4.2. Diskussion der Ergebnisse eigener Bindungsstudien

Die Bindungsenergie, Bindungsenthalpie und Bindungsentropie werden nicht unmittelbar gemessen, sondern durch Regressionsanalysen von Meßdaten ermittelt. Die Zuverlässigkeit ihrer Bestimmung ist folglich abhängig von der Streuung der Meßdaten um die Regression. Diese Streuung setzt sich zusammen aus einem Anteil der auf mangelhafter Präzision der Meßwerte beruht und aus einem Anteil, der auf mangelhafte Anpassung der Regression an diese Meßdaten zurückzuführen ist.

4.2.1. Zuverlässigkeit der Meßwerte

Die Messung radioaktiver Zerfälle ist mit einem Meßfehler $s = \sqrt{N}$ behaftet. Da die Zählzeiten soweit ausgedehnt wurden, bis etwa 10 000 Impulse ($= N$) gemessen waren, liegt der Zählfehler bei etwa 1 %. Die Zuverlässigkeit des Pipettierens, der Einhaltung der Reaktionsvolumina, -zeiten und -temperaturen sowie der Trennung von freiem und gebundenem Hapten ist durch die Daten der Tabelle I charakterisiert. In Abhängigkeit von der Haptenkonzentration liegen die Variationskoeffizienten bei 10 %.

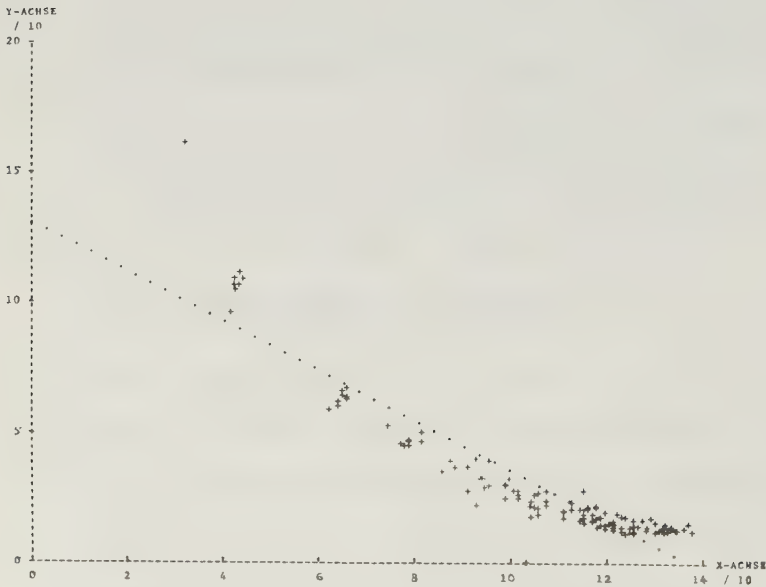
4.2.2. Zuverlässigkeit der Parameteranpassung

4.2.2.1. Lineare Regression

Die Analyse der nach Scatchard aufgetragenen Meßwerte (Tab. I, II; Abb. a - h, Anh. 2a, Abb. II, S. 44) ergab folgendes:

- a. Die Varianz der Meßwerte bei niedrigem B/q -Quotienten liegt deutlich über der Varianz anderer Meßpunkte (Tab. I, Abb. II).
- b. Die Anzahl der Meßpunkte im Bereich $0,2 \leq B/q \leq 0,3$ ist bei der mehrfach wiederholten Dialyse (Anh. 1a, Tab. a - h) zu gering (Tab. I, Abb. II). Dieser Fehler ist bei anderen Dialysen vermieden worden (Abb. 2, 3, 8, 9, 19, Anh. 2b).
- c. Die Dichte der Meßpunkte ist im Bereich $0,3 < B/q < 0,8$ als ausreichend anzusehen. Bei der gegebenen Präzision der Meßwerte ($2s_{yx} = 0,136$; Abszisseninkrement $B = 0,110$ ($= 0,661/6$)) ist durch Verkürzung der Abszissenabstände keine zusätzliche Information zu erwarten.
- d. Korrelationskoeffizient ($R = 0,96$) und Restvarianz ($s_{yx} = 0,068$) kennzeichnen die lineare Regression als befriedigend (Abb. II, S. 39). (Von den 27 Bestimmungen, die außer der mehrfach wiederholten Dialyse durchgeführt wurden, weisen 24 einen Korrelationskoeffizienten von $> 0,90$ und 20 einen Korrelations-

Abbildung II, Scatchard-Diagramm. Abszisse: B (nmol/l)
Ordinate: B/F. Antikörper: Anti-Östriol-Ak K2.
Hapten: $^3\text{H}_4$ -Östriol. Temperatur: 15°C . Zusammenfas-
sung aller Meßwerte aus Tab. a - h, Anhang 1a bzw.
Abb. a - h, Anhang 2a. Lineare Regression.



koeffizienten von $> 0,95$ auf (Tab. II)).

e. Unter den gegebenen Versuchsbedingungen ist mit Variationskoeffizienten für K von etwa 10 % und für q von etwa 3 % zu rechnen (Tab. II).

Aus den Angaben folgt, daß die lineare Regression der nach Scatchard aufgetragenen Meßdaten eine in erster Näherung befriedigende Konstruktion einer Ausgleichsgeraden ermöglicht. Die gute Passung der linearen Regression wird auch durch die Ergebnisse der Sips-Hill-Analyse bestätigt, nach denen der Heterogenitätskoeffizient α etwa gleich 1 ist ($\bar{\alpha} = 1,012$) (Tabelle IV).

Die Auswertung der nach Sips-Hill aufgetragenen Meßwerte (Tab. IV, Abb. 1 - 9, Anh. 3) ergab ebenfalls nach linearer Regression eine gute Passung der Ausgleichsgeraden. Dies ist auch an den Korrelationskoeffizienten zu erkennen, die bei 0,89 - 0,99 liegen. Es ist bemerkenswert, daß der Anstieg der Ausgleichsgeraden und damit der Wert für den Heterogenitätskoeffizienten stark von der Lage der Meßwerte abhängt, die bei $B/q > 0,8$ gewonnen wurden. Vernachlässigt man die Meßwerte dieses Bereiches, so fallen die Heterogenitätsindices auf Werte unter 1 ab, bei gleichzeitigem Anstieg der Korrelationskoeffizienten nahe 1 (z.B. Nr. 2a: $\alpha = 1,217$, $R = 0,97$; 2b: $\alpha = 0,993$, $R = 0,99$ oder 14a: $\alpha = 1,282$, $R = 0,93$; 14b:

$\alpha = 0,846$, $R = 0,99$; (Tabelle IV). Nach den Ableitungen von Deranleau (31) ist es empfehlenswert, auf Meßpunkte im Bereich $B/q > 0,8$ zu verzichten.

4.2.2.2. Kurvilineare Regression

Die Charakterisierung der Hapten-Antikörper Bindung im Scatchard-Diagramm mittels Tschebyscheff-Parameteranpassung nach Weder et al (14) erwies sich besonders deswegen als problematisch, weil schon ein einziger Meßpunkt für die Kurvenkonstruktion bestimmend wurde. In den Abbildungen 2, 3 und 5, 6 Anh. 5a wird deutlich, daß jeweils der bei niedrigster Ligandenkonzentration gewonnene Meßwert außerhalb des linearen Bereiches liegt. Gerade dieser Meßwert, der die geringste Zuverlässigkeit besitzt, wird für die Annahme der Existenz einer zweiten Antikörperpopulation bestimmend (Tabelle VI). Es ist allerdings zu bedenken, daß man bei Verzicht auf Meßwerte dieses Bereiches auch auf die Charakterisierung der Antikörperpopulation mit hoher Affinität verzichtet.

Vergleicht man die Konstanten der Tschebyscheff-Analyse (K_1 und K_2) mit denen der linearen Regressionsanalyse (K) (Tab. III und VI), so ist zu erkennen, daß K_2 immer größer und K_1 immer kleiner ist als K . Die mit Tschebyscheff-Analyse nach Weder et al (14) dargestell-

ten Bindungskurven (Abb. 19 - 25, Anh. 5b) kann man jeweils in zwei Geraden zerlegen. Dies wurde exemplarisch in Abb. 23, 25 Anh. 5b durchgeführt. Die steile Gerade repräsentiert die Bindung von Antikörpern mit hoher Affinität und niedriger Kapazität, die flache Gerade die Antikörperpopulation mit niedriger Affinität und hoher Kapazität.

Die radiale und normale Optimierung der Parameteranpassung (Tab.VI, Abb.23 Anhang 5b) läßt erkennen, daß es für die gegebenen Meßwerte mehr als eine Regression gibt. Die nach den beiden Verfahren ermittelten Ergebnisse unterscheiden sich jedoch, wie besonders beim Vergleich der graphischen Darstellungen (Abb. 23, Anh. 5b) erkennbar, nur unwesentlich.

Die Regression der Scatchard-Diagramme nach Newton-Raphson führte nur in wenigen Fällen zu definierten Regressionskurven (Abb. 11, 12, 17, Anh. 5a; Tab.VII). Dieses Verfahren reagiert offenbar weniger empfindlich auf einzelne von der Linearität abweichende Meßwerte.

Für die Daten der Versuche Nr. 13, 14 und 25 (Abb. 11, 12, 17, Anh. 5a, Tab.VII wurde mit zwei K- und zwei q-Werten eine gute kurvilineare Parameteranpassung erreicht, bei allen anderen Versuchen zur Anpassung von vier Parametern divergierte das Iterationsverfahren. Die Daten der Versuche Nr. 8, 12, 17 und 26 wurden als eindeutig linear befundet, die Da-

ten der Versuche Nr. 2, 6 und 23 nach Weglassen der Werte für die niedrigste Ligandenkonzentration. Die Daten der Versuche Nr. 1, 5, 11 und 20 waren weniger eindeutig linear angeordnet, jedoch blieben die Iterationsverfahren zum Nachweis einer Kurvilinearität ohne Ergebnis, da sie divergierten.

4.2.2.3. Regression nach Eisenthal und Cornish-Bowden

Zur Antragung der Meßwerte in Form von Geraden gemäß Eisenthal und Cornish-Bowden wurden je 5 ($= N$) Wertepaare im Bereich hoher, mittlerer und niedriger Ligandenaktivität ausgewählt (Abb. 1 - 12, Anh. 4, Tab. V, VIII). Dabei wurden maximal $1/2 N$ ($N-1$), also 10 Schnittpunkte erwartet. Tatsächlich wurde jedoch mit den Daten, die in der linearen Regressionsanalyse der Scatchard-Auftragung die höchsten Korrelationskoeffizienten aufwiesen (z.B. Nr. 3, 18 und 24; Abb. 10, 11, 12, Anh. 4) jeweils ein einziger Schnittpunkt erhalten. Die Schnittpunkte waren jedoch über einen weiten Bereich gestreut, wenn sich die Meßpunkte als eindeutig kurvilinear im Scatchard-Diagramm einordnen lassen, wie z.B. die Meßdaten des Versuches Nr. 14 (Abb. 5, Anh. 4).

4.2.3. Zuverlässigkeit der K- und q-Werte;

Homogenität der Antiseren

Experimentelle Fehler beeinflussten die K-Werte um etwa 10 %, die q-Werte um etwa 3 %, wenn diese Größen durch lineare Regression im Scatchard-Diagramm ermittelt wurden (Tab. II). Auf die offenbar gute Präzision der q-Werte ist hinzuweisen, weil diese Größen für die Auswertung nach Sips-Hill übernommen wurden. Nach Tabelle VIII stimmen die nach Scatchard, Sips-Hill und nach Eisenthal und Cornish-Bowden errechneten K- und q-Werte weitgehend überein. Dies wird als Hinweis dafür angesehen, daß die Größe der Parameter nicht wesentlich von speziellen Eigenschaften dieser Auswertverfahren abhängt.

Die relativ gute Korrelation der Meßdaten in der linearen Regression des Scatchard-Diagrammes spricht dafür, daß zur mathematischen Behandlung der Hapten-Antikörper-Bindungsreaktion das Elementarmodell (4.1.1.) zunächst ausreicht. Innerhalb der Fehlergrenzen stehen die Meßdaten nicht im Widerspruch zu der Annahme, daß in fast jedem Serum eine homogene Klasse von Antikörpern vorliegt, die Östrogene bindet. Nur das Bindungsverhalten des Anti-Östradiol-17 β -Antisera E2 (Versuch Nr. 13, 14) und des Anti-Östriol-Antisera H2 (Versuch Nr. 25) läßt sich besser be-

schreiben, wenn man von der Annahme ausgeht, daß zwei Populationen von Antikörpern mit verschiedenen Bindungsenergien vorliegen (Abb. 11, 12, 17, Anh. 5a). Mit zunehmender Temperatur bei der Gleichgewichtsdialyse werden die Evidenzen für das Vorliegen zweier verschiedener Antikörperklassen geringer (Tab. III, VII). Bemerkenswert ist auch die Tatsache, daß selbst diese Antiseren im Sips-Hill-Diagramm Heterogenitätskoeffizienten von 1,28 und 1,03 aufwiesen und somit nicht als signifikant inhomogen auffielen. Nach den vorliegenden Ergebnissen kann davon ausgegangen werden, daß die Meßdaten und die daraus errechneten Parameter K und q hinreichend präzise und richtig sind, um die Eigenschaften von Antikörpern durch sinnvolle Daten größenordnungsmäßig zu charakterisieren. Die Präzision dürfte ausreichen, um die zur Optimierung von Immunoassays notwendigen Konzentrationen angeben zu können. Sie reicht offenbar nicht aus, um auf differenzierte Bindungsprobleme, z.B. auf die Frage nach der Heterogenität der Antikörper, einzugehen.

4.2.4. Deutung der eigenen Ergebnisse und Vergleich mit Literaturangaben

Aus den vorliegenden Daten (Tab. IX) kann gefolgert werden, daß die thermodynamischen Charakteristika der Anti-Östrogen-Antisera weder von der Individualität des immunisierten Tieres noch von den Unterschieden am Ring D der östrogenen Immundeterminanten der verschiedenen Antigene abhängen. Die Assoziationskonstanten aller Antigene waren etwa gleich groß (10^9 l/mol) und erwiesen sich als temperaturabhängig. Diese Einheitlichkeit der Ergebnisse gleicht in begrenztem Umfang die Unzulänglichkeit aus, daß nicht in jedem Dialyse-Ansatz jeder einzelne Meßpunkt durch eine statistisch hinreichend große Anzahl von Mehrfachbestimmungen gesichert worden ist.

4.2.4.1. Assoziationskonstanten und Bindungsenergien

Mit Werten über 10^9 l/mol liegen die Assoziationskonstanten der untersuchten Östron-, Östradiol-17 β - und Östriol-Antikörper-Komplexe im oberen Bereich der in der Literatur für vergleichbare Reaktionspartner angegebenen Werte (Tab. X, S. 58). Die höchsten K-Werte wiesen die Komplexe von Östradiol-17 β mit den Anti-Östradiol-17 β -Antisera D2 und E2 auf (Tab. III). Es ist bemerkenswert, daß mit diesen Proben die nied-

rigsten Konzentrationen an Hapten-Bindungsstellen in die Gleichgewichtsdialysen eingesetzt worden sind. Kontrollversuche mit den Antiseren Anti-Östradiol-17 β -Antiserum C₁ und Anti-Östriol-Antiserum B₉ bewiesen eindeutig die Abhängigkeit der K-Werte von den q-Werten: wurde die Konzentration von q auf das zehnfache erhöht, dann fielen die für K ermittelten Werte auf 1/4 bis 1/5 des Ausgangswertes ab. Ähnliche Beobachtungen sind mit dem Hapten Gastrin gemacht worden (34).

Die Heterogenität der Antiseren kann kaum zur Erklärung der Abhängigkeit herangezogen werden, da die Heterogenitätskoeffizienten bei 1 lagen, und da selbst mit monoklonalem Myelomprotein der gleiche Effekt auftrat (35). Wahrscheinlicher ist es, daß Protein-Protein-Wechselwirkungen bewirken, daß mit der Konzentration des bindenden Proteins seine Affinität zum Liganden abnimmt.

4.2.4.2. Bindungs-Enthalpie und -Entropie

Die indirekte Bestimmung der Reaktions-Enthalpie (und somit auch der Entropie) nach Van't Hoff aus der Verschiebung des Reaktionsgleichgewichtes mit der Temperatur wird zunehmend kritisiert. Vergleichsuntersuchungen zeigten jedoch, daß die direkt kalorimetrisch ge-

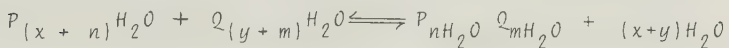
gemessenen Bindungsenthalpien von Hapten-Antikörper-Reaktionen im wesentlichen mit den Van't Hoff'schen Werten übereinstimmen (35). Als Haptene wurden DNP-Aminosäuren, Menadion und Dinitronaphtol, als bindende Globuline Antikörper oder Plasmazytomproteine eingesetzt; es wurden Enthalpiewerte von -4,5 bis -21,8 und Bindungsenergien von etwa -5,4 bis -8,7 Kcal/mol gemessen. Verglichen damit lagen die Enthalpiewerte für die Komplexbildung von Steroiden mit Anti-Steroid-Antikörpern mit -0,1 bis -4,6 Kcal/mol (36) bzw. -9,1 Kcal/mol (37) niedrig. Die Komplexbildung Lactose/Anti-Lactose-Antikörper ergab ein ΔH von -9,5 bis -11,5 Kcal/mol und ein ΔS von -4,7 bis 5,1 cal/mol K (38) (Tab. X, S. 58). In der vorliegenden Arbeit wurden für das System Östrogene Anti-Östrogen-Antikörper relativ hohe Enthalpiewerte von -7,7 bis -17,3 Kcal/mol ermittelt (Tab. X, S. 26). (Der höchste Wert hatte den niedrigsten Korrelationskoeffizienten im Van't Hoff Diagramm ($R = 0,94$), Abb. 3, Anh. 6). Die Breite dieses Bereiches wird auf die mangelhafte Präzision der einzelnen K-Werte, verbunden mit der geringen Anzahl von drei Punkten für die lineare Regression der K-Werte im Van't Hoff Diagramm zurückgeführt. Dies äußerte sich auch in der sehr großen Breite des 95 % Vertrauensbereiches. Es dürfte aber trotzdem wahrscheinlich sein, daß die

hier bestimmten Enthalpiewerte eher dem Bereich von 12 bis 15 Kcal/mol zuzuordnen sind als dem Bereich von 0,1 bis 4 Kcal/mol. Dies bedeutet für die Praxis der radioimmunologischen Bestimmungen mit Hilfe dieser Bindungsproteine, daß während der gesamten Inkubationszeit und während der Trennung der freien von den gebundenen Liganden die Temperatur konstant gehalten werden muß. Außerdem ist es zum Erreichen der maximalen Empfindlichkeit des Systems erforderlich, längere Zeit bei niedriger Temperatur zu inkubieren.

Für die Reaktions-Entropie wurden nach $\Delta S = (\Delta H - \Delta G)/T$ positive Beträge (von zwei Ausnahme abgesehen) in der Höhe von 10 bis 20 cal mol⁻¹ K⁻¹ ermittelt. In der Literatur sind unterschiedliche Entropie-Werte für Antikörper-Komplexbindungen angegeben. Für Haptene mit Dinitrophenolstruktur lagen sie (mit Ausnahmen) im niedrigen negativen Bereich von -11 bis -15 cal mol⁻¹ K⁻¹ (39); für Haptene mit Steroidstruktur im hohen positiven Bereich von ca. 50 cal mol⁻¹ K⁻¹ (36). Reaktionen von Bindungsproteinen wie Albumin, CBG, HSBG und Steroid-Rezeptoren mit ihren steroidalen Liganden verliefen mit Entropie-Änderungen von ca. 15 bis 40 cal/mol K (40) (Tab. X, S.58).

4.2.4.3. Hinweise auf die Art der Hapten-Antikörper-Wechselwirkung

Der Energiegewinn, der mit der Assoziationsreaktion von Hapten und Antikörper verbunden ist, wird auf die Kooperation zahlreicher im einzelnen schwacher Kräfte zurückgeführt. Man nimmt an, daß daran Van der Waal-Kräfte und Wasserstoff-Brückenbildung sowie elektrostatische-, charge-transfer- und hydrophobe Wechselwirkungen beteiligt sind. Für die Beurteilung der thermodynamischen Größen Reaktions-Enthalpie und -Entropie ist die Tatsache zu berücksichtigen, daß sich mit der Reaktion zwischen Antikörper und Hapten auch deren Hydratationszustand ändert. Abgesehen davon, daß Wassermoleküle frei werden können,



kann sich auch die Struktur des Wassers in der Umgebung des Haptens und der Hapten-Bindungsstelle des Antikörpers verändern und damit zusätzlich die thermodynamischen Parameter beeinflussen.

Von den genannten atomaren und molekularen Kräften, die zur Hapten-Bindung an den Antikörper führen, gelten die beiden ersten als zu vernachlässigen, da deren Energiedifferenzen zwischen dem hydratisierten Komplex und hydratisierten Komponenten klein sind. Mit

elektrostatistischen Wechselwirkungen ist im Fall der Komplexbildung mit Östrogenen nicht zu rechnen, da diese bei pH 7 nicht ionisiert sind. Für charge-transfer Wechselwirkungen könnte der phenolische A-Ring der Östrogene in Betracht gezogen werden, jedoch sind dessen Elektronen weniger stark polarisiert als in den Haptenen mit Nitrophenol-Struktur.

Der Hauptanteil des Energiegewinnes bei der Bildung von Hapten-Antikörper-Komplexen wird den hydrophoben Wechselwirkungen zugeordnet (41). Er wird auf 250 cal/mol je nm² zugänglicher Oberfläche geschätzt (42). Hiermit wird der Energiegewinn auf die Fläche bezogen, die bei der Komplexbildung dem Kontakt mit Wassermolekülen entzogen wird. Nach den besonders von Kauzmann (43) entwickelten Vorstellungen wird die negative Reaktionsenergie dieser Prozesse im wesentlichen von der Erhöhung der Entropie bestimmt, da mit der Bindung zweier hydrophober Komponenten die Unordnung der Wassermoleküle zunimmt. Bei Raumtemperatur liegt der Enthalpie-Anteil der hydrophoben Bindung bei etwa null cal mol⁻¹; der Entropiegewinn wird mit etwa 1,36 cal mol⁻¹ · K⁻¹/C-H-Bindung angegeben (44).

Aus den eigenen Ergebnissen lassen sich hinsichtlich der Ligand-Protein-Wechselwirkung zwei Folgerungen ableiten.

1. Die Dichte der Hydroxylgruppen in der immundominan-

ten Ring-D-Region der Haptene beeinflusst die Hapten-Antikörper-Wechselwirkung nicht in dem Maße, daß mit der Meßgenauigkeit der vorliegenden Arbeit ein Effekt nachzuweisen wäre. Weder die Reaktionsenergie noch ihr Enthalpie-Anteil ändert sich in der Reihe Östron, Östradiol-17 β , Östriol. Kinetische Untersuchungen (45) schließen allerdings nicht aus, daß Teile der Brücke am C-6-Atom mit in den Antikörperbindungsbe- reich eingehen und daß für eine maximale Hapten-Anti- körper-Wechselwirkung zumindest eine sp^2 -Hybridisie- rung am C-6-Atom nötig ist. Da die Bindung zwischen Antikörper und Hapten so eng ist, daß sich Tritium- isotopeneffekte auswirken (46), erscheint es möglich, daß eine veränderte Wechselwirkung zwischen Hapten und Antikörper bei Zunahme der OH-Gruppen in der Rei- he Östron, Östradiol-17 β , Östriol nur durch Untersu- chung von Östrogen-Oxim-Derivaten festgestellt werden kann.

2. Die Bindung der Östrogene an ihre korrespondieren- den Antikörper wird im wesentlichen von der Reaktions- enthalpie getrieben. Die negative Enthalpie dieser Reaktionen liegt in der gleichen Größenordnung wie die Enthalpie der Bindung von Dinitrophenol-Derivaten durch die entsprechenden Antikörper, die kalorimetrisch bestimmt worden ist (35). Für andere Ligand-Protein- Komplexe liegen gleichsinnige Daten vor (Tab.Xb, S.58).

Eine Erklärung für die geringen Enthalpie-Anteile der in Tabelle Xa aufgeführten Reaktionsenergien kann nicht gegeben werden.

Tabelle X. Reaktions-Energie, -Enthalpie und Entropie der Komplexbildung von Liganden mit Proteinen.

a. Entropiegetriebene-, b. Enthalpiegetriebene Reaktionen

Ligand-Protein-Komplex	ΔG (Kcal/mol)	ΔH (Kcal/mol)	ΔS (cal/mol·K)	Ref.
a. Aldosteron/Ak	-12,2	-3	42	(36)
Digoxin/Ak	-11,3	1,6	55	(36)
Östradiol/Ak	-13,3	-4,6	40	(47)
Östriol/Ak	-11,8	0	51	(36)
Testosteron/Ak	-12,5	-1	50	(36)
b. Östradiol/Ak	-12,6	-9,1	11,5	(37)
DNP-Lysin/Ak	-10,4	-14,8	-14,9	(39)
DNP-Glycin/Ak	-10,2	-16,8	-22,3	(48)
Östradiol/HSBG	-12,1	-5,4	22,5	(40)
Cortisol/CBG	-11,3	-15,0	-13	(49)
TNP-Lysin/Protein 315	-9,6	-12,3	-9,8	(35)
Dinitronaphthol/Protein 460	-8,0	-14,8	-24,4	(35)
Menadion/Protein 460	-6,4	-4,1	8,3	(35)

Diese Ergebnisse sind ebenso wie die der vorliegenden Arbeit Beispiele dafür, daß die Bindung von Liganden an Proteine auch modellartig nicht hinreichend richtig durch das entropiegetriebene Verhalten von Kohlenwasser-

stoff-Molekülen in wässrigen Lösungen wiedergegeben wird. Die von Klotz (50) entwickelten Vorstellungen über enthalpiegetriebene Bildung von Clathrat-Strukturen des Wassers bei der Entstehung apolarer Bindungen sind der unmittelbaren Einsicht nicht in gleichem Maße zugänglich wie die Erhöhung der Unordnung der Wassermoleküle nach Kauzmann (43). Die von Klotz (50) geforderte Enthalpie-Änderung liegt jedoch auch den Hapten-Antikörper Reaktionen als hauptsächlichster Antrieb zugrunde. Offenbar reicht der Stand der Kenntnisse dazu aus, die möglichen Wechselwirkungen aufzuzählen; es muß aber die Entwicklung neuer Methoden abgewartet werden, um die Bedeutung der einzelnen Faktoren differenzieren zu können.

Zusammenfassung

Die Bindung von Östrogenen an korrespondierende Anti-Östrogen-Antikörper wurde mit Gleichgewichtsdialyse untersucht. Es wurde die Komplexbildung von radioaktiv markiertem Östron, Östradiol-17 β , und Östriol mit je drei korrespondierenden Anti-Östrogen-C6-Konjugat-Antikörpern bei 15 $^{\circ}$, 25 $^{\circ}$ und 35 $^{\circ}$ C gemessen.

Die Bindungsdaten wurden nach Scatchard, Sips-Hill, Eisenthal und Cornish-Bowden, Tschelycheff und Newton Raphson ausgewertet und die Gleichgewichtskonstanten K, Hapten-Bindungsstellen-Konzentrationen der Antikörper q und Heterogenitätsindices α unter Zuhilfenahme von Computerprogrammen berechnet.

Die Präzision der Meßdaten und der K- und q-Werte wurde charakterisiert. Der Variationskoeffizient betrug für K 10 %, für q 3 %.

Die Reaktions-Enthalpie und -Entropie wurde nach Van't Hoff bestimmt. Folgende Ergebnisse wurden erzielt:
 $K = 0,1 \text{ bis } 5,7 \cdot 10^9 \text{ l/mol}$, $q = 0,5 \text{ bis } 7,7 \cdot 10^{-9} \text{ mol/l}$,
 $\alpha = 0,85 \text{ bis } 1,21$ $\Delta G = -13 \text{ bis } -15 \text{ Kcal/mol}$,
 $\Delta H = -7 \text{ bis } -17 \text{ Kcal/mol}$ und $\Delta S = -14 \text{ bis } -21 \text{ cal/mol} \cdot \text{Grad}$. Die Östrogen/Anti-Östrogen-Antikörper Komplexbildung erwies sich als exotherme enthalpiegetriebene Reaktion.

Literatur

1. Yamamoto, K.R., Alberts, B.M., Steroid Receptors: Elements for Modulation of Eukaryotic Transcription. Ann. Rev. Biochem. 45, 721 - 746 (1976).
2. Edelstein, D.J., Cooperative Interactions of Hemoglobin. Ann. Rev. Biochem. 44, 209 - 232 (1975).
3. Anton, A.H., Solomon, H.M. (Eds.) Annals New York Acad. Sciences 226 (1973). Drug Protein Binding.
4. Cameron, E.H.D., Hillier, S.G., Griffiths, K., Steroid Immunoassay. Cardiff, Alpha Omega Publishing Ltd. 1975.
5. Ekins R.P., Newmann G.B., O'Riordan J.L., Theoretical Aspects of Saturation and Radioimmunoassay. In: Radioisotopes in Medicine: In Vitro Studies. Hayes R.L., Gositz F.A., Murphy B.E., P. 59 (Eds. U.S. Atomic Energy Commission) Oak Ridge, Tenn. 1968.
6. Knuppen R., Rao M.L., Breuer H., Eine Methode zur Bestimmung von 25 Östrogenen im Urin mit Hilfe der kombinierten Papier-Dünnschicht- und Gas-Chromatographie. Fresenius Z.f. Anal. Chemie 243, 263 - 272 (1968).
7. Carr B.R., Mikhail G., Flickinger G.L., Column Chromatography of Steroids on Sephadex LH-20. Jour. of Clin. Endocrin. and Metabol. 33, 358 - 360 (1971).
8. Kuss E., Goebel R., Determination of Estrogens by Radioimmunoassay with Antibodies to Estrogen-C₆-Conjugates. Syntheses of Estrone-, Estradiol-17 β - and Estriol-C-6-Albumin Conjugates. Steroids 19, 505 - 518 (1972).

9. Kuss, E., Goebel, R., Enderle, H., Steroids as Immunochemical Probes I. Influence of Oxo-, and/or Hydroxy-Groups at C-16/C-17 of Estrogens on Affinity to Anti-Estrone-, Anti-Estradiol-17 α - and Anti-Estradiol-17 β -Antisera. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 354, 347 - 364 (1973).
10. Hebert, G.A., Pelham, P.L., Pittmann, B., Determination of the Optimal Ammonium Sulfate Concentration for the Fractionation of Rabbit, Sheep, Horse and Goat Antisera. Applied Microbiology 25, 26 - 36 (1973).
11. Scatchard, G., The Attractions of Proteins for Small Molecules and Ions. Ann. New York Acad. Sc., 51, 660 - 672 (1949) nach: Rodbard, D., Mathematics of Hormon-Receptor Interaction. I Basic Principles. In: Receptors for Reproductive Hormones, P. 289 - 327 (Eds. O'Malley, B.W. and Means, A.R.) Plenum Press, New York, London 1973.
12. Sips, R., J. Chem. Phys. 16, 490 (1948). Nach: Werblin, Th., Kim, Y.T. Smith, Ch., Siskind, G.W., Technical Problems in Equilibrium Dialysis. Immunochemistry 10, 3 - 7 (1973).
13. Eisenthal, R., Cornish-Bowden, A., The Direct Linear Plot. A New Graphical Procedure for Estimating Enzyme Kinetic Parameters. Biochem. J. 139, 715 - 720 (1974).
14. Weder, H.G., Schildknecht, J., Lutz, R.A., Kesselring, P., Determination of Binding Parameters from Scatchard Plots. Theoretical and Practical Considerations. Eur. J. Biochem. 42, 475 - 482 (1974).
15. Feldmann, H.A., Mathematical Theory of Complex Ligand-Binding Systems at Equilibrium: Some Methods for Parameter Fitting. Anal. Biochem. 48, 317 - 338 (1972).

16. Michaelis, L., Menten, M.L., *Biochem. Z.* 49, 333 - 369 (1913) Nach: Merino, F.D.M., A New Method for Determining the Michaelis Constant. *Biochem. J.* 143, 93 - 95 (1974).
17. Adamson, A.W., *Physical Chemistry of Surfaces*. 2. Aufl. P. 398 - 402 Interscience Publishers, New York, London, Sidney 1967.
18. Hofstee, B.H.J., On the Evaluation of the Constants V_m and K_m in Enzyme Reactions. *Science* 116, 329 - 331 (1952).
19. Lineweaver, H., Burk, D., *J. Am. Chem. Soc.* 56, 65 (1934) Nach: Rodbard, D., Mathematics of Hormone-Receptor Interaction. I. Basic Principles. In: *Receptors for Reproductive Hormones* P. 289 - 327 (Eds. O'Malley, B.W., and Means, A.R.) Plenum Press, New York - London, 1973.
20. Klotz, I.M., *Physicochemical Aspects of Drug-Protein Interactions: A General Perspective*. *Drug Protein Binding*. *Ann. New York Acad. Sc.* 226, 18 - 36 (1973).
21. Baulieu, E.E. and Raynaud, J.P., A "Proportion Graph" Method for Measuring Binding Systems. *Eur. J. Biochem.* 13, 293 - 304 (1970).
22. Porter, W.R., Trager, W.F., Improved Non-Parametric Statistical Methods for the Estimation of Michaelis-Menten Kinetic Parameters by the Direct Linear Plot. *Biochem. J.* 161, 293 - 302 (1977).
23. Bannister, W.H., Anastasi, Angela, and Bannister, J.V., Least Squares Estimation for Michaelis-Menten Parameters by a Fibonacci Search. *Method. FEBS Letters* 64, 290 - 292 (1976).

24. Thompson, C.J., Klotz, I.M., *Macromolecule-Small Molecule Interactions: Analytical and Graphical Reexamination*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 147, 178 - 185 (1971).
25. Rodbard, D., *Mathematics of Hormon-Receptor Interaction. I Basic Principles*. In: *Receptors for Reproductive Hormones*, P. 289 - 327 (Eds. O'Malley, B.W. and Means, A.R.) Plenum Press, New York - London 1973.
26. Haselkorn, D., Friedman, S., Givol, D., Pecht, I., *Kinetic Mapping of the Antibody Combining Site by Chemical Relaxation Spectrometry*. *Biochemistry* 13, 2210 - 2222, (1974).
27. Rosenthal, H.E., *A Graphic Method for the Determination and Presentation of Binding Parameters in a Complex System*. *Analyt. Biochem.* 20, 525 - 532 (1967).
28. Klotz, I.M., Hunston, D.L., *Properties of Graphical Representations of Multiple Classes of Binding Sites*. *Biochemistry* 10, 3065 - 3069 (1971).
29. Nisonoff, A., Pressmann, D., *Heterogeneity and Average Combining Constants of Antibodies from Individual Rabbits*. *J. Immunol.* 80, 417 - 428 (1958).
30. Werblin, T., Kim, V.T., Smith, Ch., and Siskind, G.W., *Technical Problems in Equilibrium Dialysis*. *Immunochemistry* 10, 3 - 7 (1973).
31. Deranleau, D.A., *Theory of the Measurement of Weak Molecular Complexes. I. General Considerations*. *J. Am. Chem. Soc.* 91, 4044 - 4054 (1969).

32. Berson, S.A. and Valow, R.S., Quantitative Aspects of the Reaction between Insulin and Insulin-Binding Antibody. *J. Clin. Invest.* 38, 1996 - 2016 (1959).
33. Rodbard, D., Feldman, H.A., Theory of Protein-Ligand Interaction. In: *Methods in Enzymology* XXXVI Part A (Eds. O'Malley and Hardman) P. 3 - 16 (1975).
34. Goldenberg, K., Berkowitz, J.M., and Praissman, M., Methods in the Quantitation of Antigen-Antibody Reactions Measured by Radioimmunoassay: Application to the Gastrin System Revealing Large and Restricted Binding Energies. *J. Immunol.* 112, 1008 - 1019 (1974).
35. Johnston, M.F.M., Barisas, B.G. and Sturtevant, J.M., Thermodynamics of Hapten Binding to MOPC 315 and MOPC 460 Mouse Myeloma Proteins. *Biochemistry* 13, 390 - 396 (1974).
36. Keane, P.M., Walker, W.H.C., Gauldie, J., Abraham, G.E., Thermodynamic Aspects of Some Radioassays. *Clin. Chem.* 22, 70 - 73 (1976).
37. Malvano, R., Roller, E., Rosa, U., Standardization and Control of Steroid Radioimmunoassay. *International Atomic Energy Agency - SM*, 177/203, 97 - 122 (1974).
38. Ghose, A.C. and Karush, F., Energetics and Spectral Changes in Ligand Binding by Homogeneous Rabbit Anti-Lactose Antibody. *Biochemistry* 13, 1959 - 1965 (1974).
39. Halsey, J.F., Cebra, J.J. and Biltonen, R.L., Structural and Thermodynamic Basis of Affinity in Anti-Dinitrophenyl Antibody. *Biochemistry* 14, 5221 - 5224 (1975).

40. Lutz, R.A., Wiegand, K.W., Weder, H.G., Problems in Studying Protein Binding with the Regard to the Interaction of Steroids with a Specific Binding Globulin. In: Protein-Ligand Interactions, P. 385 - 399 (Ed. Sund, H. and Blauer, G.) Walter de Gruyter, Berlin, New York 1975.
41. Wurmser, R., Thermodynamic Study of Antigen-Antibody Reactions. In: Experimental Methods of Biophysical Chemistry, 613 - 647 (Ed. Claude Nicolau), J. Wiley et son, London 1973.
42. Chothia, C., Structural Invariants in Protein Folding. Nature 254, 304 - 308 (1975).
43. Kauzmann, W., Adv. Protein Chem. 14, 1 (1959). Nach: Tait, M., Franks, F., Water in Biological Systems. Nature 230, 91 - 95 (1971).
44. Gill, S.J., Wadsö, I., An equation of State Describing Hydrophobic Interactions. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 73, 2955 - 2958 (1976).
45. Hötzing, H., Dissertation
46. Jeffcoate, S.L., Edwards, R., Gilby, E.D. and White, N., The Use of ^3H -Labelled Ligands in Steroid Radioimmunoassays. In: Steroid Immunoassay. P. 133 - 141. (Eds. Cameron, E.H.D., Hillier, S.G., Griffiths, K.) Cardiff, Alpha Omega Publishing Ltd. 1975.
47. Abraham, G.E. and Odell, W.D., In Immunologic Methods in Steroid Determination, F.G. Peron and B.V. Caldwell, Eds. Appleton-Century-Crofts, New York, N.Y., 1970, P. 87, nach: Keane, P.M., Walker, W.H.C., Gauldie, J., Abraham, G.E., Thermodynamic Aspects of Some Radioassays. Clin. Chem. 22, 70 - 73 (1976).

48. Archer, B.G., Krakauer, H., Thermodynamic of Antibody-Antigen Reactions. 1. The Binding of Simple Haptens to Two Classes of Antibodies Fractionated According to Affinity. *Biochemistry*, 16, 615 - 617 (1977).
49. Westphal, U., Preparation and Characteristics of Corticosteroid-Binding Globulin (CBG, Transcortin). In: *Karolinska Symposia on Research Methods in Reproductive Endocrinology*. 2nd Symposium. Steroid Assay by Protein Binding. P. 122 - 143 (Eds. E Diczfalussy). Bogtrykkeriet Forum Copenhagen. 1970.
50. Klotz, I., *Brookhaven Symp. Biol.* 13, 25 (1960). Nach: Tait, M., Franks, F., *Water in Biological Systems*. *Nature* 230, 91 - 95 (1971).

Anhang 1: BINDUNGSDATEN. Anhang 1a, Tabelle a-h: Präzision.

Gleichgewichtsdialyse: a

Antikörper: Anti-E 3-Ak K2

Ligand: $^3\text{H}_4$ -Östriol

Temperatur: 15°C

Messwerte:
(nMol/l)

Transformierte
Messwerte:

B+F (a) B+F (b) B F B/F

0,86	0,82	0,42	0,39	1,06
1,73	1,63	0,64	0,98	0,65
2,60	2,46	0,78	1,68	0,49
3,46	3,38	0,90	2,47	0,36
4,33	4,16	0,98	3,27	0,26
5,19	5,06	1,04	4,01	0,26
6,06	5,57	1,07	4,50	0,23
6,93	6,65	1,12	5,53	0,20
7,79	6,72	1,14	5,57	0,20
8,66	8,07	1,18	6,88	0,17
9,53	6,41	1,21	7,62	0,15
10,39	10,12	1,25	8,86	0,14
11,26	10,42	1,26	9,16	0,13
12,13	11,53	1,28	10,30	0,12
12,99	12,65	1,29	11,35	0,11

(a) eingesetzt

(b) wiedergefunden

Gleichgewichtsdialyse: b

Antikörper: Anti-E3-Ak K2

Ligand: $^3\text{H}_4$ -Östriol

Temperatur: 15°C

Messwerte:
(nMol/l)

Transformierte
Messwerte:

B+F (a) B+F (b) B F B/F

0,86	0,83	0,42	0,40	1,04
1,73	1,64	0,65	0,98	0,66
2,60	2,56	0,81	1,74	0,46
3,46	3,21	0,90	3,30	0,27
4,33	4,19	1,00	3,19	0,31
5,19	5,01	1,07	3,94	0,27
6,06	5,45	1,03	4,41	0,23
6,93	6,59	1,16	5,43	0,21
7,79	7,41	1,19	6,21	0,19
8,66	8,35	1,23	7,11	0,17
9,53	9,12	1,27	7,85	0,16
10,39	9,89	1,17	8,72	0,13
11,26	10,78	1,31	9,46	0,14
12,13	12,04	1,34	10,70	0,12
12,99	12,23	1,47	12,08	0,12

(a) eingesetzt

(b) wiedergefunden

Gleichgewichtsdialyse: c

Antikörper: Anti-E 3-Ak K2

Ligand: $^3\text{H}_4$ -Östriol

Temperatur: 15°C

Messwerte:
(nMol/l)

Transformierte
Messwerte:

B+F (a) B+F (b) B F B/F

0,86	0,84	0,41	0,43	0,95
1,73	1,70	0,64	1,06	0,60
2,60	2,45	0,77	1,68	0,45
3,46	3,10	0,87	2,23	0,39
4,33	4,20	0,94	3,25	0,28
5,19	4,67	1,01	3,66	0,27
6,06	5,95	1,04	4,90	0,21
6,93	6,50	1,17	5,32	0,22
7,79	7,59	1,10	6,48	0,17
8,66	8,25	1,14	7,10	0,16
9,53	8,83	1,29	7,54	0,17
10,39	10,31	1,19	9,11	0,13
11,26	11,05	1,21	9,83	0,12
12,13	11,63	1,22	10,40	0,12
12,99	12,40	1,23	11,16	0,11

(a) eingesetzt

(b) wiedergefunden

Gleichgewichtsdialyse: d

Antikörper: Anti-E3-Ak K2

Ligand: $^3\text{H}_4$ -Östriol

Temperatur: 15°C

Messwerte:
(nMol/l)

Transformierte
Messwerte:

B+F (a) B+F (b) B F B/F

0,86	0,84	0,43	0,40	1,06
1,73	1,66	0,64	1,01	0,64
2,60	2,48	0,78	1,69	0,46
3,46	3,29	0,88	2,41	0,36
4,33	3,81	0,93	2,87	0,32
5,19	4,87	1,01	3,86	0,26
6,06	5,28	1,15	4,13	0,27
6,93	6,64	1,10	5,53	0,20
7,79	7,38	1,15	6,23	0,18
8,66	8,41	1,16	7,25	0,16
9,53	9,29	1,20	8,08	0,14
10,39	10,23	1,22	9,00	0,13
11,26	10,70	1,28	9,42	0,13
12,13	11,79	1,25	10,53	0,11
12,99	12,33	1,25	11,07	0,11

(a) eingesetzt

(b) wiedergefunden

Gleichgewichtsdialyse: e

Antikörper: Anti-E3-Ak K2

Ligand: $^3\text{H}_4$ -Östriol

Temperatur: 15°C

Messwerte:
(nMol/l)

Transformierte
Messwerte:

B+F (a)	B+F (b)	B	F	B/F
0,86	0,84	0,44	0,40	1,08
1,73	1,68	0,66	1,06	0,58
2,60	2,44	0,81	1,62	0,50
3,46	3,25	0,92	2,33	0,39
4,33	4,09	0,99	3,10	0,32
5,19	4,99	1,05	3,94	0,26
6,06	6,03	1,12	4,91	0,22
6,93	6,76	1,17	5,58	0,21
7,79	7,75	1,22	6,53	0,18
8,66	8,26	1,22	6,98	0,17
9,53	9,02	1,25	7,76	0,16
10,39	9,82	1,29	8,53	0,15
11,26	10,94	1,33	9,61	0,13
12,13	11,90	1,35	10,54	0,12
12,99	12,64	1,21	11,43	0,10

(a) eingesetzt

(b) wiedergefunden

Gleichgewichtsdialyse: f

Antikörper: Anti-E3-Ak K2

Ligand: $^3\text{H}_4$ -Östriol

Temperatur: 15°C

Messwerte:
(nMol/l)

Transformierte
Messwerte:

B+F (a)	B+F (b)	B	F	B/F
0,86	0,81	0,42	0,39	1,08
1,73	1,68	0,64	1,04	0,61
2,60	2,52	0,77	1,74	0,44
3,46	3,30	0,85	2,45	0,34
4,33	4,16	0,95	3,21	0,29
5,19	4,98	0,98	4,00	0,24
6,06	5,87	1,03	4,83	0,21
6,93	6,77	1,05	5,71	0,18
7,79	6,92	1,03	5,88	0,17
8,66	8,61	1,15	7,46	0,20
9,53	9,41	1,18	8,22	0,14
10,39	10,08	1,21	8,86	0,13
11,26	10,71	1,24	9,46	0,13
12,13	11,75	1,30	10,44	0,12
12,99	12,52	1,32	11,19	0,11

(a) eingesetzt

(b) wiedergefunden

Gleichgewichtsdialyse: g

Antikörper: Anti-E3-Ak K2

Ligand: $^3\text{H}_4$ -Östriol

Temperatur: 15°C

Messwerte:
(nMol/l)

Transformierte
Messwerte:

B+F (a)	B+F (b)	B	F	B/F
0,86	0,83	0,43	0,39	1,11
1,73	1,67	0,65	1,04	0,63
2,60	2,16	0,74	1,42	0,52
3,46	3,36	1,12	2,24	0,46
4,33	4,13	0,92	4,21	0,21
5,19	5,05	1,01	4,04	0,25
6,06	5,95	1,07	4,88	0,21
6,93	6,74	1,10	5,63	0,19
7,79	7,97	1,15	6,82	0,16
8,66	8,49	1,16	7,32	0,15
9,53	9,47	1,19	8,27	0,14
10,39	9,17	1,21	7,95	0,15
11,26	10,36	1,36	9,02	0,15
12,13	12,02	1,34	10,67	0,12
12,99	12,80	1,31	11,49	0,11

(a) eingesetzt

(b) wiedergefunden

Gleichgewichtsdialyse: h

Antikörper: Anti-E3-Ak K2

Ligand: $^3\text{H}_4$ -Östriol

Temperatur: 15°C

Messwerte:
(nMol/l)

Transformierte
Messwerte:

B+F (a)	B+F (b)	B	F	B/F
0,86	0,51	0,32	0,19	1,60
1,73	1,71	0,65	1,05	0,62
2,60	2,55	0,78	1,76	0,44
3,46	3,38	0,95	2,43	0,39
4,33	4,31	0,98	3,32	0,29
5,19	5,17	1,03	4,14	0,24
6,06	6,05	1,05	4,99	0,21
6,93	6,85	1,16	5,69	0,20
7,79	7,54	1,16	6,37	0,18
8,66	8,23	1,17	7,05	1,16
9,53	9,37	1,21	8,16	0,14
10,39	10,14	1,32	8,82	0,14
11,26	11,18	1,31	9,86	0,13
12,13	11,52	1,33	10,19	0,13
12,99	12,91	1,37	11,53	0,12

(a) eingesetzt

(b) wiedergefunden

Anhang 1b, Tabelle 1-27: Bindungsstudien

Gleichgewichtsdialyse: Nr. 1

Antikörper: Anti-E1-Ak H2

Ligand: $^3\text{H}_4$ -Üstron

Temperatur: 15°C

Messwerte: (nMol/l) Transformierte Messwerte:

B+F (a)	B+F (b)	B	F	B/F
0,64	0,57	0,46	0,11	4,17
0,92	0,90	0,70	0,20	3,46
1,66	1,57	1,11	0,46	2,40
2,31	2,24	1,48	0,75	1,95
3,51	3,42	2,03	1,38	1,46
4,44	4,32	2,56	1,96	1,20
5,09	4,95	2,54	2,40	1,05
6,01	5,74	2,87	2,87	1,00
7,40	7,24	3,14	4,09	0,76
8,79	8,51	3,42	5,09	0,67
9,72	9,27	3,54	6,13	0,57
11,11	10,57	3,52	7,04	0,54
12,50	12,43	4,00	8,35	0,48
13,89	13,53	4,22	9,31	0,45
15,27	15,05	4,37	10,68	0,40

(a) eingesetzt
(b) wiedergefunden

Gleichgewichtsdialyse: Nr. 2

Antikörper: Anti-E1-Ak H2

Ligand: $^3\text{H}_4$ -Üstron

Temperatur: 25°C

Messwerte: (nMol/l) Transformierte Messwerte:

B+F (a)	B+F (b)	B	F	B/F
0,74	0,69	0,46	0,23	2,00
1,38	1,37	0,75	0,61	1,24
1,85	1,83	1,03	0,79	1,30
2,31	2,24	1,20	1,04	1,15
2,96	2,77	1,39	1,38	1,01
3,70	3,64	1,77	1,87	0,95
5,18	5,07	2,15	2,94	0,73
6,85	6,76	2,60	4,16	0,62
7,77	7,70	2,77	4,93	0,56
8,70	8,53	3,00	5,53	0,54
10,64	10,39	3,25	7,14	0,46
12,33	11,96	3,46	8,50	0,41
13,89	13,66	3,70	9,90	0,37
15,00	14,84	3,81	11,00	0,34
16,29	16,23	4,00	12,23	0,33

(a) eingesetzt
(b) wiedergefunden

Gleichgewichtsdialyse: Nr. 3

Antikörper: Anti-E1-Ak H2

Ligand: $^3\text{H}_4$ -Üstron

Temperatur: 35°C

Messwerte: (nMol/l) Transformierte Messwerte:

B+F (a)	B+F (b)	B	F	B/F
0,74	0,64	0,30	0,34	0,89
1,29	1,22	0,61	0,61	1,00
2,12	1,94	0,90	1,03	0,87
2,96	2,78	1,15	1,60	0,72
3,96	3,92	1,51	2,40	0,63
5,55	5,51	1,88	3,62	0,52
7,22	7,06	2,27	4,78	0,47
9,26	8,87	2,56	6,30	0,40
10,64	10,35	2,87	7,48	0,38
11,11	10,94	2,84	8,10	0,35
12,96	12,67	3,01	9,65	0,31
13,42	13,37	3,22	10,14	0,31
14,63	14,35	3,36	10,99	0,30
15,00	14,81	3,24	11,57	0,28
15,74	15,40	3,27	12,13	0,27

(a) eingesetzt
(b) wiedergefunden

Gleichgewichtsdialyse: Nr. 4

Antikörper: Anti-E1-Ak J2

Ligand: $^3\text{H}_4$ -Üstron

Temperatur: 15°C

Messwerte: (nMol/l) Transformierte Messwerte:

B+F (a)	B+F (b)	B	F	B/F
0,83	0,75	0,69	0,65	1,06
1,85	1,75	1,43	0,31	4,57
2,50	2,36	1,94	0,42	4,57
3,51	3,42	2,57	0,85	3,02
4,35	4,30	3,10	1,20	2,57
5,74	5,55	3,51	2,03	1,72
7,87	7,49	4,30	3,18	1,35
9,26	9,18	4,66	4,51	1,03
10,64	10,55	4,90	5,64	0,86
12,22	12,12	5,26	6,85	0,76
13,61	13,50	5,37	8,13	0,66
14,81	14,65	5,50	9,14	0,60
16,11	16,01	5,90	10,11	0,58
18,52	17,57	5,83	11,74	0,49
18,52	17,96	5,83	12,13	0,48

(a) eingesetzt
(b) wiedergefunden

Gleichgewichtsdialyse: Nr. 5

Antikörper: Anti-E1-Ak J2

Ligand: $^3\text{H}_2\text{Üstron}$

Temperatur: 25°C

Messwerte:
(nMol/l)

Transformierte
Messwerte:

B+F (a)	B+F (b)	B	F	B/F
1,01	0,94	0,75	0,18	4,10
1,85	1,76	1,34	0,42	3,15
2,87	2,82	1,99	0,83	2,38
3,70	3,66	2,35	1,31	1,78
4,44	4,36	2,73	1,62	1,67
5,55	5,36	3,51	2,96	1,18
7,96	7,84	3,89	3,94	0,98
8,88	8,75	4,12	4,63	0,89
10,37	10,33	4,31	6,01	0,71
11,57	11,46	4,42	7,03	0,62
13,42	13,24	4,63	8,61	0,53
15,27	15,00	4,81	10,18	0,47
17,13	16,70	4,85	11,85	0,40
18,05	17,59	4,90	12,68	0,38

(a) eingesetzt

(b) wiedergefunden

Gleichgewichtsdialyse: Nr. 6

Antikörper: Anti-E1-Ak J2

Ligand: $^3\text{H}_2\text{Üstron}$

Temperatur: 35°C

Messwerte:
(nMol/l)

Transformierte
Messwerte:

B+F (a)	B+F (b)	B	F	B/F
0,74	0,66	0,53	0,12	4,14
1,57	1,49	1,00	0,49	2,03
2,40	2,36	1,49	0,87	1,71
3,33	3,32	1,88	1,43	1,31
4,63	4,49	2,31	2,17	1,06
5,74	5,79	2,96	2,83	1,04
7,40	7,17	3,16	4,00	0,78
8,79	8,77	3,47	5,30	0,65
10,64	10,18	3,81	6,37	0,59
12,96	12,86	4,18	8,67	0,48
15,09	14,05	4,27	10,65	0,40
15,92	15,75	4,26	11,49	0,37
17,13	17,07	4,64	12,42	0,37
19,26	19,09	4,63	14,46	0,32
20,83	20,64	4,82	15,61	0,30

(a) eingesetzt

(b) wiedergefunden

Gleichgewichtsdialyse: Nr. 7

Antikörper: Anti-E1-Ak K2

Ligand: $^3\text{H}_2\text{Üstron}$

Temperatur: 15°C

Messwerte:
(nMol/l)

Transformierte
Messwerte:

B+F (a)	B+F (b)	B	F	B/F
1,38	1,36	1,12	0,24	4,69
2,77	2,51	1,97	0,52	3,75
4,16	3,80	2,71	1,08	2,51
5,54	5,37	3,56	1,80	1,97
6,93	6,50	4,06	2,44	1,66
8,32	7,84	4,66	3,17	1,47
9,70	9,21	4,91	4,29	1,14
11,09	10,78	5,41	5,36	1,01
12,48	12,13	5,76	6,37	0,90
13,86	13,34	5,76	7,57	0,76
15,25	14,90	5,84	9,06	0,64
16,64	15,48	6,10	9,38	0,65
18,02	16,95	6,26	10,68	0,58
19,41	18,23	6,55	11,67	0,56
20,80	20,39	6,65	13,73	0,48

(a) eingesetzt

(b) wiedergefunden

Gleichgewichtsdialyse: Nr. 8

Antikörper: Anti-E1-Ak K2

Ligand: $^3\text{H}_2\text{Üstron}$

Temperatur: 25°C

Messwerte:
(nMol/l)

Transformierte
Messwerte:

B+F (a)	B+F (b)	B	F	B/F
1,38	1,31	0,69	0,61	1,11
2,77	2,67	1,21	1,46	0,82
4,16	4,08	1,83	2,25	0,81
5,54	5,14	2,19	2,94	0,74
6,93	6,29	2,59	3,69	0,70
8,32	7,68	2,91	4,77	0,61
9,70	9,16	3,43	5,73	0,59
11,09	10,28	3,55	6,73	0,52
12,48	12,09	4,07	8,01	0,50
13,86	13,04	4,10	8,94	0,45
15,25	14,34	4,68	9,66	0,48
16,64	15,81	4,64	11,17	0,41
18,02	16,74	4,84	11,89	0,40
19,41	18,97	5,01	13,96	0,35
20,80	19,76	5,49	14,27	0,38

(a) eingesetzt

(b) wiedergefunden

Gleichgewichtsdialyse: Nr. 9
Antikörper: Anti-E1-Ak K2
Ligand: $^3\text{H}_4$ -Östron
Temperatur: 35°C

Messwerte: Transformierte
(nMol/l) Messwerte:

B+F (a)	B+F (b)	B	F	B/F
1,38	1,36	0,53	0,83	0,64
2,77	2,70	1,02	1,67	0,61
4,16	4,09	1,48	2,60	0,57
5,54	5,28	1,84	3,44	0,53
6,93	6,76	2,22	4,53	0,49
8,32	8,21	2,56	5,64	0,45
9,70	9,26	2,87	6,38	0,45
11,09	10,78	3,19	7,58	0,42
12,48	12,02	3,18	8,84	0,35
13,86	13,10	3,38	9,72	0,34
15,25	14,44	3,69	10,74	0,34
16,64	16,33	3,93	12,39	0,31
18,02	12,37	3,77	8,59	0,43
19,41	18,06	4,20	13,85	0,30
20,80	20,30	4,25	16,04	0,26

(a) eingesetzt
(b) wiedergefunden

Gleichgewichtsdialyse: Nr. 10
Antikörper: Anti-E2-Ak D2
Ligand: $^3\text{H}_4$ -Östradiol-17ß
Temperatur: 15°C

Messwerte: Transformierte
(nMol/l) Messwerte:

B+F (a)	B+F (b)	B	F	B/F
0,27	0,20	0,14	0,05	0,26
0,27	0,23	0,16	0,07	2,26
0,36	0,33	0,22	0,11	2,00
0,45	0,38	0,23	0,14	1,61
0,45	0,43	0,26	0,18	1,45
0,55	0,49	0,29	0,21	1,39
0,73	0,68	0,32	0,34	0,91
0,91	0,77	0,34	0,42	0,82
1,10	0,91	0,39	0,52	0,75
1,28	1,12	0,42	0,69	0,60
1,37	1,24	0,44	0,79	0,55
1,56	1,45	0,47	0,97	0,48
1,65	1,59	0,48	1,11	0,43
1,83	1,77	0,51	1,25	0,40
2,02	1,81	0,49	1,32	0,37

(a) eingesetzt
(b) wiedergefunden

Gleichgewichtsdialyse: Nr. 11
Antikörper: Anti-E2-Ak D2
Ligand: $^3\text{H}_4$ -Östradiol-17ß
Temperatur: 25°C

Messwerte: Transformierte
(nMol/l) Messwerte:

B+F (a)	B+F (b)	B	F	B/F
0,27	0,21	0,13	0,07	1,87
0,36	0,27	0,16	0,11	1,50
0,45	0,35	0,20	0,15	1,29
0,55	0,46	0,23	0,22	1,04
0,73	0,64	0,29	0,34	0,84
0,82	0,76	0,31	0,45	0,69
1,01	0,90	0,34	0,55	0,63
1,10	1,03	0,37	0,66	0,56
1,28	1,17	0,40	0,77	0,52
1,47	1,32	0,42	0,90	0,46
1,56	1,44	0,43	1,01	0,42
1,65	1,59	0,45	1,14	0,39
1,83	1,76	0,45	1,30	0,35
2,02	1,89	0,47	1,41	0,33
2,29	2,03	0,48	1,54	0,31

(a) eingesetzt
(b) wiedergefunden

Gleichgewichtsdialyse: Nr. 12
Antikörper: Anti-E2-Ak D2
Ligand: $^3\text{H}_4$ -Östradiol-17ß
Temperatur: 35°C

Messwerte: Transformierte
(nMol/l) Messwerte:

B+F (a)	B+F (b)	B	F	B/F
0,27	0,22	0,11	0,11	0,92
0,45	0,42	0,17	0,24	0,70
0,64	0,56	0,21	0,35	0,58
0,73	0,65	0,22	0,42	0,54
0,82	0,75	0,24	0,50	0,49
1,01	0,98	0,29	0,68	0,42
1,19	1,11	0,32	0,79	0,40
1,28	1,22	0,33	0,89	0,37
1,47	1,38	0,35	1,02	0,34
1,65	1,60	0,38	1,22	0,31
1,83	1,78	0,40	1,37	0,29
1,92	1,89	0,40	1,48	0,27
2,20	2,06	0,41	1,65	0,24

(a) eingesetzt
(b) wiedergefunden

Gleichgewichtsdialyse: Nr. 13

Antikörper: Anti-E2-Ak E2

Ligand: $^3\text{H}_2$ -Östradiol-17 β

Temperatur: 15°C

Messwerte: Transformierte
(nMol/l) Messwerte:

B+F (a) B+F (b) B F B/F

0,13	0,09	0,07	0,01	4,49
0,27	0,19	0,13	0,04	3,20
0,36	0,31	0,19	0,10	1,91
0,55	0,54	0,30	0,23	1,29
1,19	1,16	0,45	0,72	0,62
1,83	1,74	0,55	1,38	0,40
2,94	2,86	0,65	2,21	0,29
4,31	4,25	0,76	3,48	0,21
5,51	5,45	0,82	4,63	0,17
7,81	7,63	0,91	6,71	0,13
9,64	9,30	0,97	8,32	0,11
18,38	9,83	0,97	9,28	0,10

(a) eingesetzt

(b) wiedergefunden

Gleichgewichtsdialyse: Nr. 14

Antikörper: Anti-E2-Ak E2

Ligand: $^3\text{H}_2$ -Östradiol-17 β

Temperatur: 25°C

Messwerte: Transformierte
(nMol/l) Messwerte:

B+F (a) B+F (b) B F B/F

0,27	0,21	0,11	0,09	1,30
0,36	0,31	0,16	0,14	1,12
0,55	0,48	0,22	0,25	0,89
0,73	0,69	0,29	0,40	0,72
1,01	0,95	0,35	0,59	0,59
1,28	1,20	0,40	0,79	0,50
1,47	1,39	0,44	0,95	0,46
2,57	2,44	0,51	1,92	0,26
2,94	2,89	0,57	2,31	0,24
3,30	3,24	0,62	2,61	0,23
4,22	4,11	0,66	3,45	0,19
5,69	5,55	0,73	4,81	0,15
6,61	6,54	0,75	5,78	0,13
6,98	6,91	0,73	6,17	0,11

(a) eingesetzt

(b) wiedergefunden

Gleichgewichtsdialyse: Nr. 15

Antikörper: Anti-E2-Ak E2

Ligand: $^3\text{H}_2$ -Östradiol-17 β

Temperatur: 35°C

Messwerte: Transformierte
(nMol/l) Messwerte:

B+F (a) B+F (b) B F B/F

0,45	0,41	0,13	0,27	0,49
0,64	0,58	0,20	0,38	0,52
1,01	0,92	0,24	0,68	0,36
1,47	1,42	0,34	1,08	0,31
2,20	2,12	0,45	1,67	0,26
3,21	3,15	0,54	2,60	0,20
3,76	3,71	0,60	3,10	0,19
4,59	4,49	0,68	3,80	0,18
5,97	5,90	0,76	5,14	0,14
6,89	6,81	0,80	6,01	0,13
7,07	7,05	0,82	6,73	0,13
7,71	7,64	0,82	6,81	0,12
8,54	8,47	0,86	7,60	0,11
9,46	9,35	0,88	8,47	0,10
10,10	9,94	0,90	9,04	0,09

(a) eingesetzt

(b) wiedergefunden

Gleichgewichtsdialyse: Nr. 16

Antikörper: Anti-E2-Ak F2

Ligand: $^3\text{H}_2$ -Östradiol-17 β

Temperatur: 15°C

Messwerte: Transformierte
(nMol/l) Messwerte:

B+F (a) B+F (b) B F B/F

0,91	0,85	0,56	0,23	2,00
1,83	1,70	0,92	0,78	1,18
2,73	2,60	1,27	1,33	0,95
3,67	3,41	1,50	1,90	0,78
4,58	4,36	1,81	2,55	0,71
5,50	5,26	2,00	3,25	0,61
6,42	5,88	2,06	3,81	0,54
7,34	6,85	2,24	4,63	0,48
8,25	8,04	2,38	5,66	0,42
9,17	8,76	2,38	6,37	0,37
10,09	9,83	2,39	7,44	0,32
11,01	10,22	2,57	7,64	0,33
11,93	9,99	2,40	7,59	0,31
12,84	12,08	2,66	9,42	0,28
13,76	12,69	2,75	9,93	0,27

(a) eingesetzt

(b) wiedergefunden

Gleichgewichtsdialyse: Nr.17

Antikörper: Anti-E2-Ak F2

Ligand: $^3\text{H}_2$ -Östradiol-17 β

Temperatur: 25°C

Messwerte: Transformierte
(nMol/l) Messwerte:

B+F (a)	B+F (b)	B	F	B/F
0,91	0,89	0,41	0,47	0,86
1,83	1,69	0,70	0,99	0,71
2,73	2,56	0,94	1,61	0,58
3,67	3,40	1,14	2,25	0,50
4,58	4,44	1,36	3,07	0,44
5,50	5,19	1,54	3,65	0,42
6,42	5,68	1,57	4,10	0,38
7,34	7,04	1,79	5,25	0,34
8,25	7,61	2,01	5,59	0,36
9,17	8,58	1,93	6,64	0,29
10,09	9,43	2,09	7,34	0,28
11,01	9,27	2,03	7,24	0,28
11,93	11,36	2,16	9,19	0,23
12,84	12,28	2,34	9,93	0,23
13,76	12,44	2,40	10,04	0,24

(a) eingesetzt
(b) wiedergefunden

Gleichgewichtsdialyse: Nr.18

Antikörper: Anti-E2-Ak F2

Ligand: $^3\text{H}_2$ -Östradiol-17 β

Temperatur: 35°C

Messwerte: Transformierte
(nMol/l) Messwerte:

B+F (a)	B+F (b)	B	F	B/F
0,91	0,89	0,32	0,56	0,56
1,83	1,75	0,56	1,19	0,46
2,73	2,61	0,78	1,82	0,43
3,67	3,27	0,91	2,35	0,38
4,58	4,35	1,12	3,23	0,34
5,50	5,36	1,26	4,10	0,30
6,42	6,27	1,45	4,82	0,30
7,34	7,14	1,57	5,56	0,28
8,25	7,50	1,56	5,93	0,26
9,17	8,90	1,72	7,17	0,24
10,09	9,86	1,79	8,07	0,22
11,01	10,43	1,87	8,56	0,21
11,93	11,12	1,95	9,17	0,21
12,84	12,57	2,07	10,49	0,19
13,76	13,02	2,03	10,96	0,18

(a) eingesetzt
(b) wiedergefunden

Gleichgewichtsdialyse: Nr.19

Antikörper: Anti-E3-Ak J2

Ligand: $^3\text{H}_2$ -Östriol

Temperatur: 15°C

Messwerte: Transformierte
(nMol/l) Messwerte:

B+F (a)	B+F (b)	B	F	B/F
0,39	0,34	0,24	0,10	2,33
0,69	0,64	0,41	0,22	1,84
1,04	1,00	0,59	0,41	1,41
1,38	1,36	0,75	0,60	1,27
2,17	2,10	1,01	1,09	0,92
2,95	2,90	1,17	1,73	0,67
3,81	3,74	1,30	2,44	0,53
4,68	4,66	1,44	3,21	0,45
5,46	5,39	1,56	3,83	0,40
6,33	6,09	1,57	4,51	0,34
6,77	6,67	1,65	5,01	0,33
8,24	8,17	1,75	6,42	0,27
9,54	9,41	1,86	7,55	0,24
10,41	10,19	1,85	8,33	0,22
12,15	11,92	1,94	9,98	0,19

(a) eingesetzt
(b) wiedergefunden

Gleichgewichtsdialyse: Nr.20

Antikörper: Anti-E3-Ak J2

Ligand: $^3\text{H}_2$ -Östriol

Temperatur: 25°C

Messwerte: Transformierte
(nMol/l) Messwerte:

B+F (a)	B+F (b)	B	F	B/F
0,43	0,35	0,20	0,14	1,41
0,69	0,62	0,31	0,31	1,00
1,12	1,05	0,46	0,58	0,80
1,56	1,46	0,59	0,86	0,69
2,17	2,10	0,75	1,35	0,55
3,03	2,95	0,91	2,04	0,44
4,34	4,17	1,08	3,09	0,35
5,55	5,45	1,23	4,22	0,29
7,55	7,43	1,38	6,05	0,22
8,94	8,86	1,43	7,43	0,19
9,72	9,55	1,50	8,05	0,18
10,76	10,66	1,51	9,15	0,16
11,97	11,87	1,57	10,29	0,15
12,67	12,56	1,56	11,00	0,14
15,27	15,19	1,64	13,55	0,12

(a) eingesetzt
(b) wiedergefunden

Gleichgewichtsdialyse: Nr.21

Antikörper: Anti-E3-Ak J2

Ligand: ^3H -Östriol

Temperatur: 35°C

Messwerte: Transformierte
(nMol/l) Messwerte:

B+F (a) B+F (b) B F B/F

0,52	0,48	0,12	0,36	0,33
1,04	0,98	0,21	0,76	0,28
1,82	1,80	0,36	1,44	0,25
2,86	2,84	0,50	2,34	0,21
3,38	3,35	0,58	2,77	0,24
3,99	3,90	0,64	3,26	0,19
4,94	4,62	0,72	3,90	0,18
5,20	5,12	0,76	4,35	0,17
6,07	6,05	0,85	5,20	0,16
6,94	6,90	0,92	5,98	0,15
7,46	7,42	0,91	6,51	0,14
7,98	7,87	0,91	6,96	0,13
8,50	8,33	0,97	7,36	0,13
9,46	9,29	1,03	8,62	0,11
10,85	10,41	1,04	9,37	0,11

(a) eingesetzt

(b) wiedergefunden

Gleichgewichtsdialyse: Nr.22

Antikörper: Anti-E3-Ak K2

Ligand: ^3H -Östriol

Temperatur: 15°C

Messwerte: Transformierte
(nMol/l) Messwerte:

B+F (a) B+F (b) B F B/F

0,86	0,82	0,42	0,39	1,06
1,73	1,63	0,65	0,98	0,65
2,60	2,47	0,78	1,68	0,46
3,46	3,38	0,91	2,48	0,36
4,33	4,17	0,98	3,16	0,31
5,19	5,07	1,05	4,02	2,62
6,06	5,58	1,07	4,51	0,23
6,93	6,66	1,13	5,54	0,20
7,79	6,72	1,14	5,55	0,20
8,66	8,07	1,19	6,90	0,17
9,53	8,85	1,21	7,62	0,15
10,39	10,13	1,26	8,89	0,14
11,26	10,43	1,27	9,17	0,13
12,13	11,59	1,28	10,30	0,12
12,99	12,66	1,30	11,40	0,11

(a) eingesetzt

(b) wiedergefunden

Gleichgewichtsdialyse: Nr.23

Antikörper: Anti-E3-Ak K2

Ligand: ^3H -Östriol

Temperatur: 25°C

Messwerte: Transformierte
(nMol/l) Messwerte:

B+F (a) B+F (b) B F B/F

0,86	0,81	0,34	0,46	0,74
1,73	1,68	0,50	1,18	0,46
2,60	2,52	0,61	1,91	0,32
3,46	3,31	0,69	2,62	0,26
4,33	4,19	0,76	3,43	0,22
5,19	4,90	0,81	4,01	0,20
6,06	5,66	0,85	4,81	0,17
6,93	6,55	0,89	5,65	0,15
7,79	7,22	0,91	6,30	0,14
8,66	8,29	0,95	7,34	0,13
9,53	9,19	0,97	8,21	0,11
10,39	9,79	0,98	9,29	0,10
11,26	9,31	0,99	10,05	0,09
12,13	11,43	1,00	10,40	0,09
12,99	12,04	1,15	11,10	0,10

(a) eingesetzt

(b) wiedergefunden

Gleichgewichtsdialyse: Nr.24

Antikörper: Anti-E3-Ak K2

Ligand: ^3H -Östriol

Temperatur: 35°C

Messwerte: Transformierte
(nMol/l) Messwerte:

B+F (a) B+F (b) B F B/F

0,86	0,83	0,19	0,64	0,29
1,73	1,67	0,35	1,32	0,26
2,60	2,46	0,46	2,08	0,22
3,46	3,43	0,56	2,88	0,19
4,33	4,23	0,64	3,60	0,17
5,19	5,01	0,69	4,31	0,16
6,06	5,78	0,73	5,04	0,14
6,93	6,51	0,78	5,74	0,13
7,79	7,54	0,83	6,70	0,12
8,66	8,04	0,85	7,20	0,11
9,53	8,74	0,87	7,86	0,11
10,39	9,96	0,91	9,06	0,10
11,26	10,73	0,92	9,81	0,09
12,13	10,56	0,94	10,90	0,08
12,99	12,65	0,95	11,71	0,08

(a) eingesetzt

(b) wiedergefunden

Gleichgewichtsdialyse: Nr.25

Antikörper: Anti-E3-Ak H2

Ligand: $^3\text{H}_2$ -Östriol

Temperatur: 15°C

Messwerte:
(nMol/l)

Transformierte
Messwerte:

B+F (a)	B+F (b)	B	F	B/F
0,43	0,40	0,23	0,17	1,30
0,78	0,76	0,34	0,41	0,83
1,30	1,29	0,49	0,79	0,61
2,08	2,06	0,62	1,44	0,43
3,21	3,12	0,77	2,35	0,32
4,07	3,99	0,85	3,13	0,27
5,38	5,29	0,96	4,33	0,22
6,51	6,42	1,03	5,39	0,19
8,24	7,98	1,10	6,88	0,16
9,54	9,37	1,14	8,22	0,13
10,58	10,41	1,16	9,25	0,12
11,47	11,28	1,22	10,06	0,12
12,58	12,49	1,20	11,29	0,10
14,32	14,04	1,26	12,79	0,09

(a) eingesetzt
(b) wiedergefunden

Gleichgewichtsdialyse: Nr.26

Antikörper: Anti-E3-Ak H2

Ligand: $^3\text{H}_2$ -Östriol

Temperatur: 25°C

Messwerte:
(nMol/l)

Transformierte
Messwerte:

B+F (a)	B+F (b)	B	F	B/F
0,69	0,64	0,20	0,43	0,47
1,04	1,02	0,31	0,71	0,43
1,56	1,47	0,40	1,12	0,36
2,08	2,06	0,50	1,56	0,32
3,12	3,07	0,64	2,43	0,26
4,34	4,30	0,76	3,54	0,21
5,20	5,13	0,81	4,32	0,18
5,64	5,59	0,82	4,77	0,17
6,51	6,33	0,86	5,48	0,15
7,81	7,79	0,93	6,85	0,13
9,54	9,35	1,02	8,33	0,12
10,41	10,38	1,01	9,37	0,10
11,45	11,33	1,09	10,24	0,10
12,15	11,96	1,05	10,90	0,09

(a) eingesetzt
(b) wiedergefunden

Gleichgewichtsdialyse: Nr.27

Antikörper: Anti-E3-Ak H2

Ligand: $^3\text{H}_2$ -Östriol

Temperatur: 35°C

Messwerte:
(nMol/l)

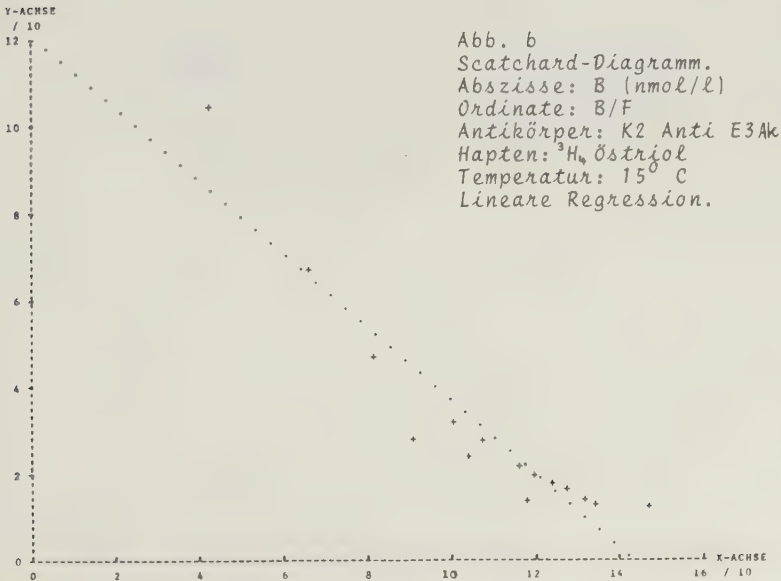
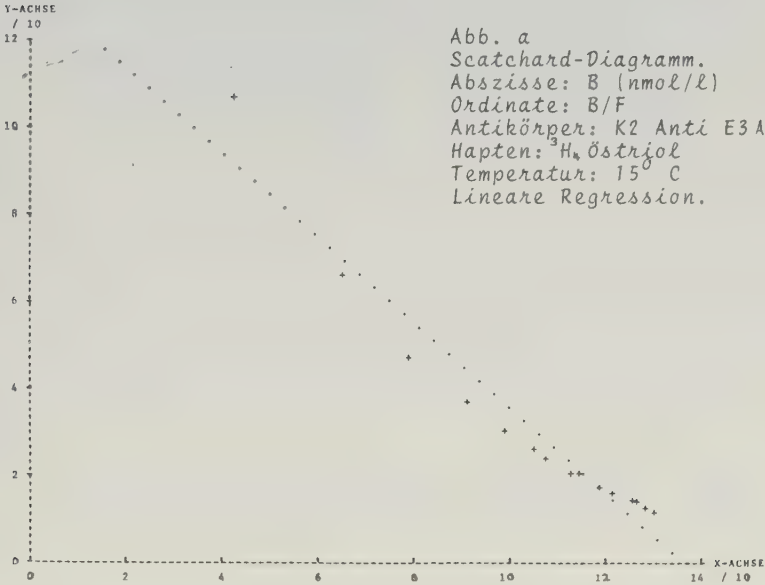
Transformierte
Messwerte:

B+F (a)	B+F (b)	B	F	B/F
0,60	0,56	0,13	0,43	0,29
0,95	0,90	0,20	0,69	0,29
1,64	1,55	0,30	1,24	0,24
2,43	2,37	0,41	1,96	0,21
2,95	2,89	0,47	2,41	0,19
3,90	3,85	0,55	3,29	0,16
4,86	4,80	0,62	4,18	0,14
5,81	5,72	0,69	5,03	0,13
6,94	6,83	0,74	6,09	0,12
7,46	7,44	0,76	6,68	0,11
9,98	9,83	0,86	8,97	0,09
10,58	10,48	0,85	9,63	0,08
11,45	11,18	0,86	10,39	0,08
12,15	11,96	0,97	10,98	0,09

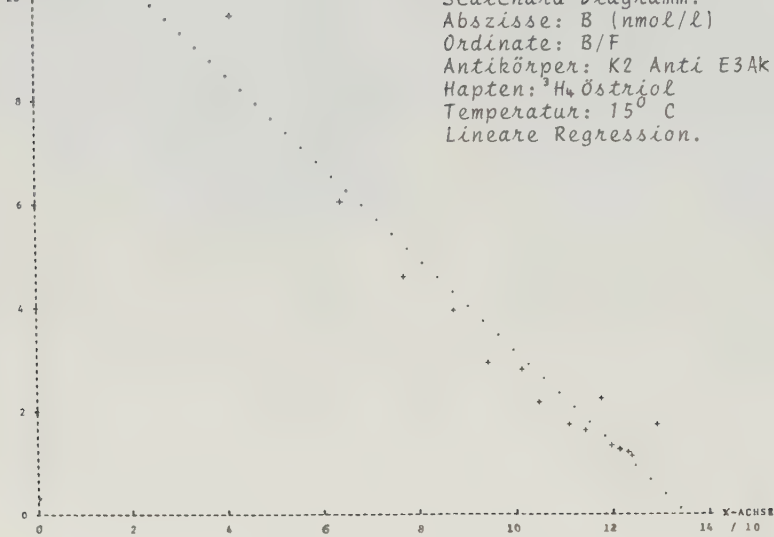
(a) eingesetzt
(b) wiedergefunden

Anhang 2: SCATCHARD DIAGRAMME MIT LINEARER REGRESSION

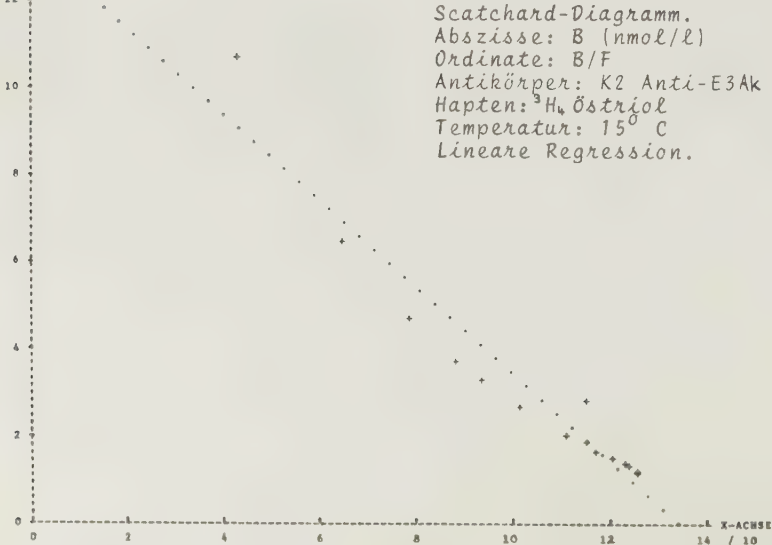
Anhang 2a, Abb. a - h:
Präzision

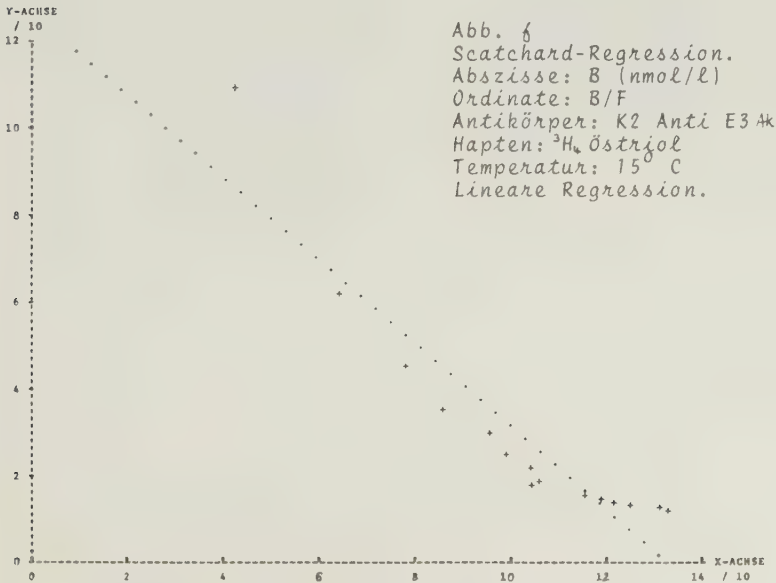
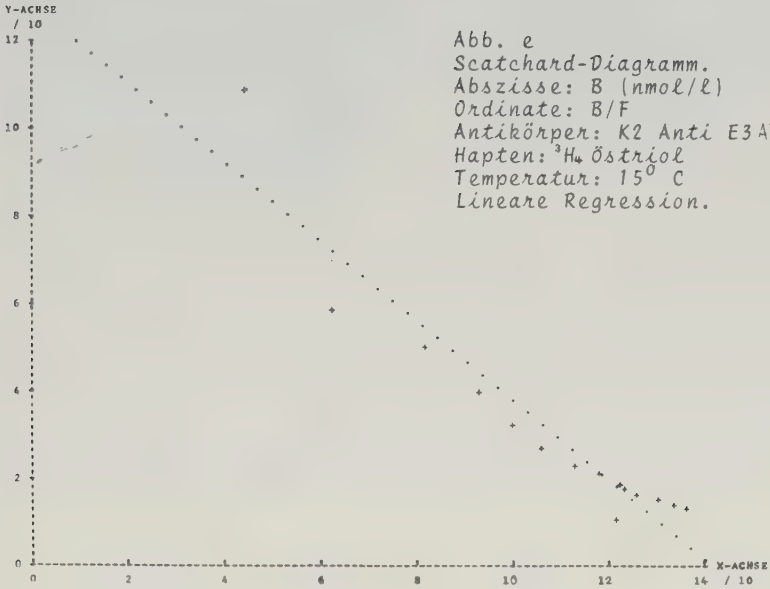


Y-ACHSE
/ 10



Y-ACHSE
/ 10





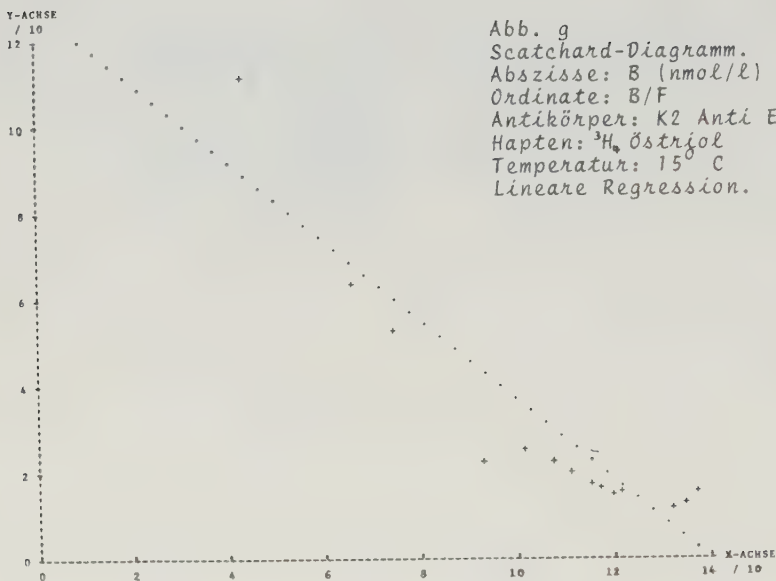


Abb. g
Scatchard-Diagramm.
Abszisse: B (nmol/l)
Ordinate: B/F
Antikörper: K2 Anti E3 Ak
Hapten: $^3\text{H}_4$ Östrijol
Temperatur: 15°C
Lineare Regression.

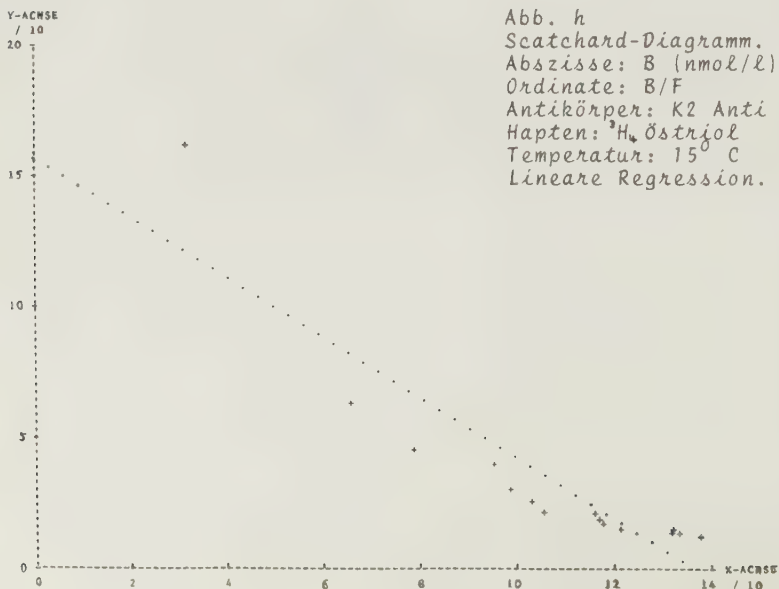
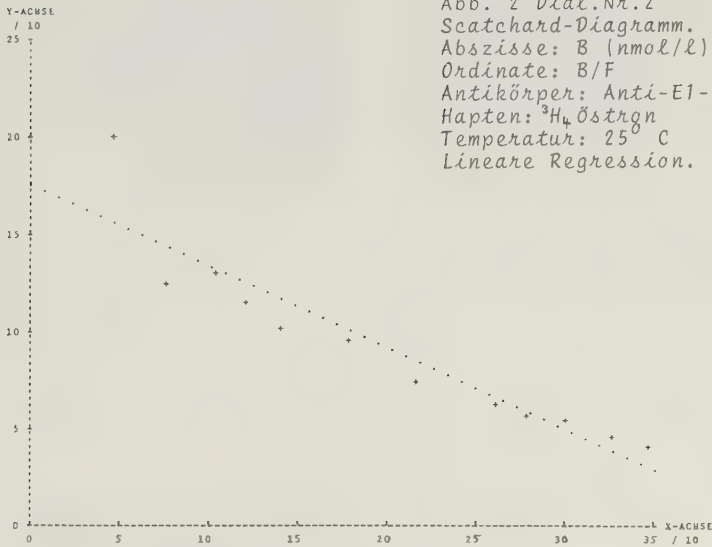
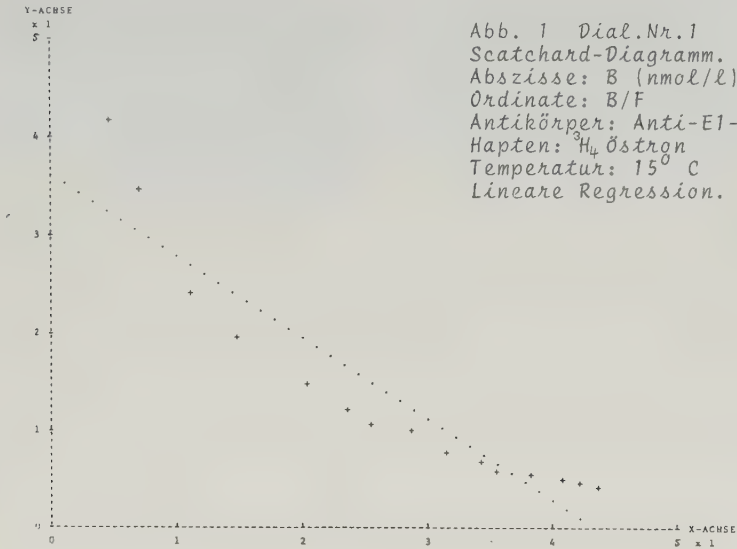
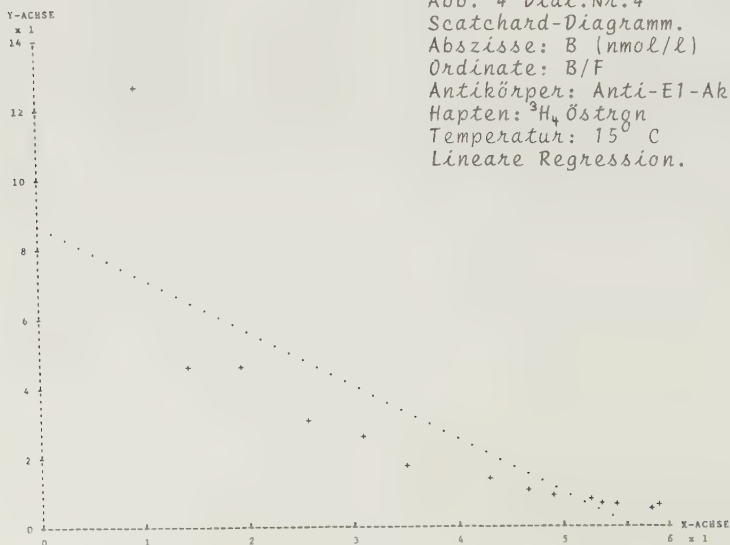
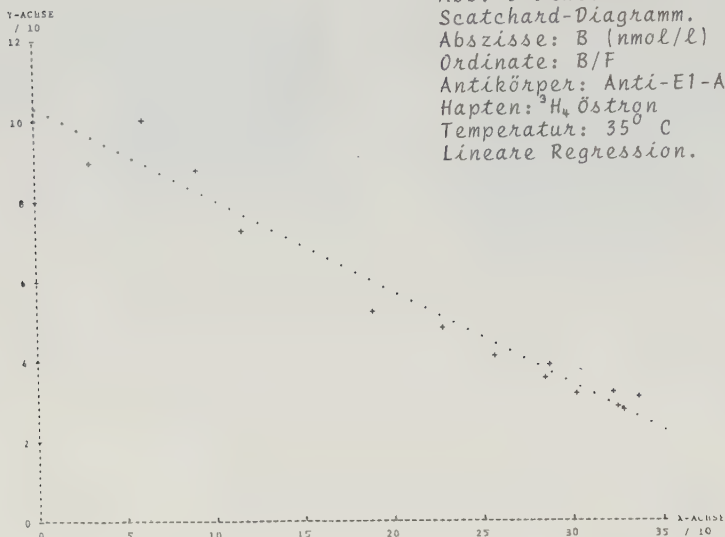


Abb. h
Scatchard-Diagramm.
Abszisse: B (nmol/l)
Ordinate: B/F
Antikörper: K2 Anti E3 Ak
Hapten: $^3\text{H}_4$ Östrijol
Temperatur: 15°C
Lineare Regression.

Anhang 2: SCATCHARD DIAGRAMME MIT LINEARER REGRESSION

Anhang 2b, Abb. 1 - 27: Bindungsstudien





Y-ACHSE

$\times 1$

5

4

3

2

1

0

0

1

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

33

34

35

36

37

38

39

40

41

42

43

44

45

46

47

48

49

50

51

52

53

54

55

56

57

58

59

60

61

62

63

64

65

66

67

68

69

70

71

72

73

74

75

76

77

78

79

80

81

82

83

84

85

86

87

88

89

90

91

92

93

94

95

96

97

98

99

100

101

102

103

104

105

106

107

108

109

110

111

112

113

114

115

116

117

118

119

120

121

122

123

124

125

126

127

128

129

130

131

132

133

134

135

136

137

138

139

140

141

142

143

144

145

146

147

148

149

150

151

152

153

154

155

156

157

158

159

160

161

162

163

164

165

166

167

168

169

170

171

172

173

174

175

176

177

178

179

180

181

182

183

184

185

186

187

188

189

190

191

192

193

194

195

196

197

198

199

200

201

202

203

204

205

206

207

208

209

210

211

212

213

214

215

216

217

218

219

220

221

222

223

224

225

226

227

228

229

230

231

232

233

234

235

236

237

238

239

240

241

242

243

244

245

246

247

248

249

250

251

252

253

254

255

256

257

258

259

260

261

262

263

264

265

266

267

268

269

270

271

272

273

274

275

276

277

278

279

280

281

282

283

284

285

286

287

288

289

290

291

292

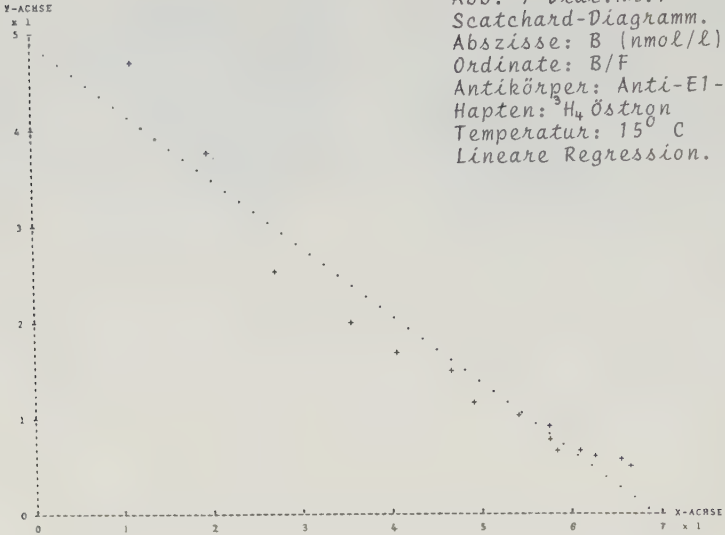


Abb. 7 Dial.Nr.7
Scatchard-Diagramm.
Abszisse: B (nmol/l)
Ordinate: B/F
Antikörper: Anti-E1-Ak K2
Hapten: $^3\text{H}_4$ Östron
Temperatur: 15°C
Lineare Regression.

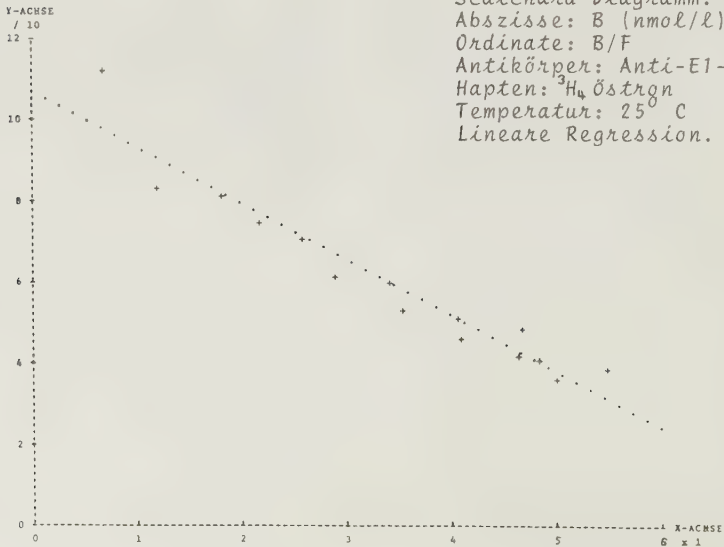
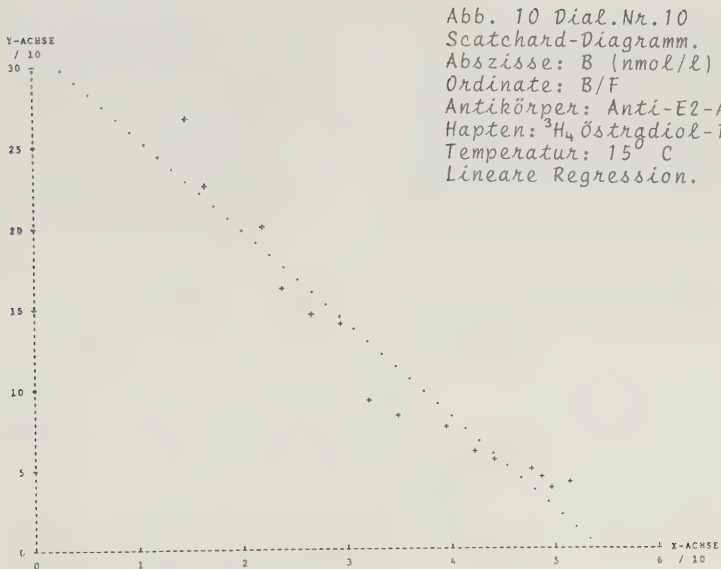
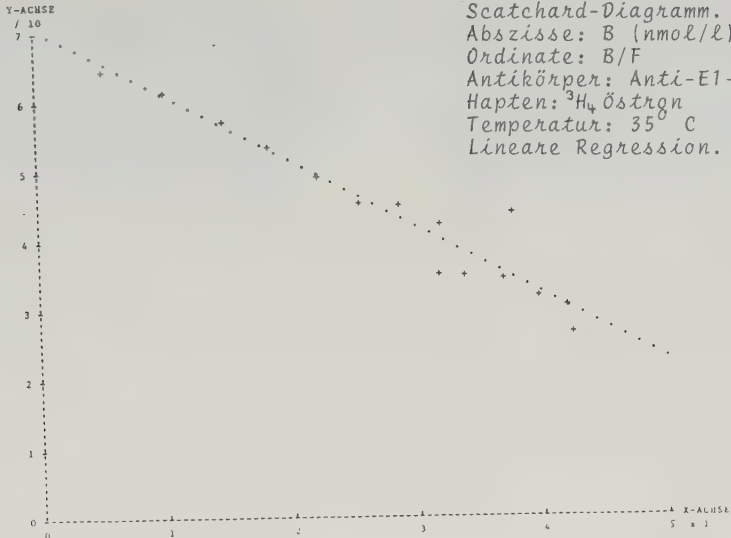


Abb. 8 Dial.Nr.8
Scatchard-Diagramm.
Abszisse: B (nmol/l)
Ordinate: B/F
Antikörper: Anti-E1-Ak K2
Hapten: $^3\text{H}_4$ Östron
Temperatur: 25°C
Lineare Regression.



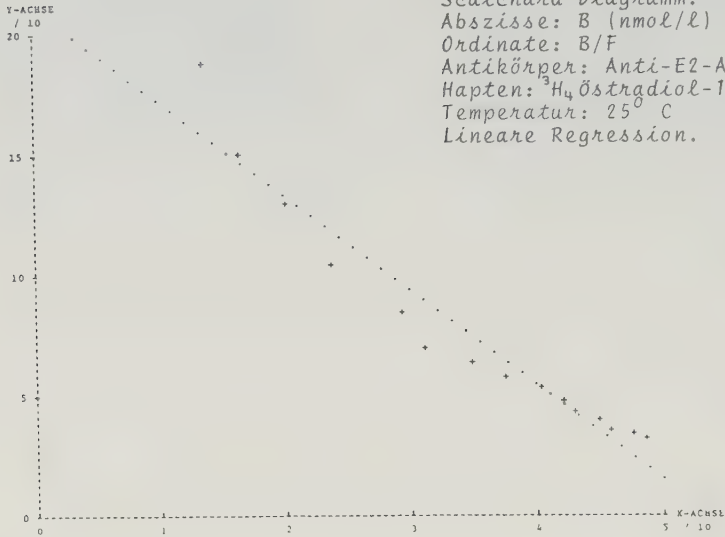


Abb. 11 Dial.Nr.11
Scatchard-Diagramm.
Abszisse: B (nmol/l)
Ordinate: B/F
Antikörper: Anti-E2-Ak D2
Hapten: $^3\text{H}_4$ Östradiol-17 β
Temperatur: 25° C
Lineare Regression.

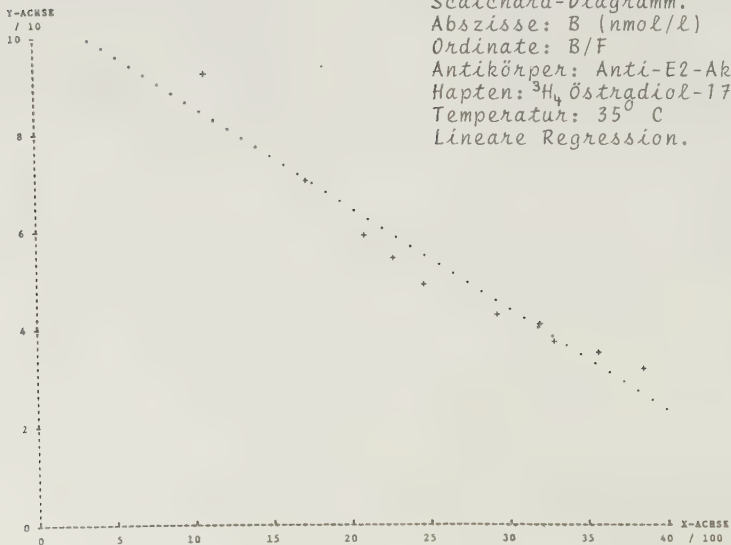


Abb. 12 Dial.Nr.12
Scatchard-Diagramm.
Abszisse: B (nmol/l)
Ordinate: B/F
Antikörper: Anti-E2-Ak D2
Hapten: $^3\text{H}_4$ Östradiol-17 β
Temperatur: 35° C
Lineare Regression.

Y-ACHSE

x 1

5

4

3

2

1

0

0

1

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

33

34

35

36

37

38

39

40

41

42

43

44

45

46

47

48

49

50

51

52

53

54

55

56

57

58

59

60

61

62

63

64

65

66

67

68

69

70

71

72

73

74

75

76

77

78

79

80

81

82

83

84

85

86

87

88

89

90

91

92

93

94

95

96

97

98

99

100

101

102

103

104

105

106

107

108

109

110

111

112

113

114

115

116

117

118

119

120

121

122

123

124

125

126

127

128

129

130

131

132

133

134

135

136

137

138

139

140

141

142

143

144

145

146

147

148

149

150

151

152

153

154

155

156

157

158

159

160

161

162

163

164

165

166

167

168

169

170

171

172

173

174

175

176

177

178

179

180

181

182

183

184

185

186

187

188

189

190

191

192

193

194

195

196

197

198

199

200

201

202

203

204

205

206

207

208

209

210

211

212

213

214

215

216

217

218

219

220

221

222

223

224

225

226

227

228

229

230

231

232

233

234

235

236

237

238

239

240

241

242

243

244

245

246

247

248

249

250

251

252

253

254

255

256

257

258

259

260

261

262

263

264

265

266

267

268

269

270

271

272

273

274

275

276

277

278

279

280

281

282

283

284

285

286

287

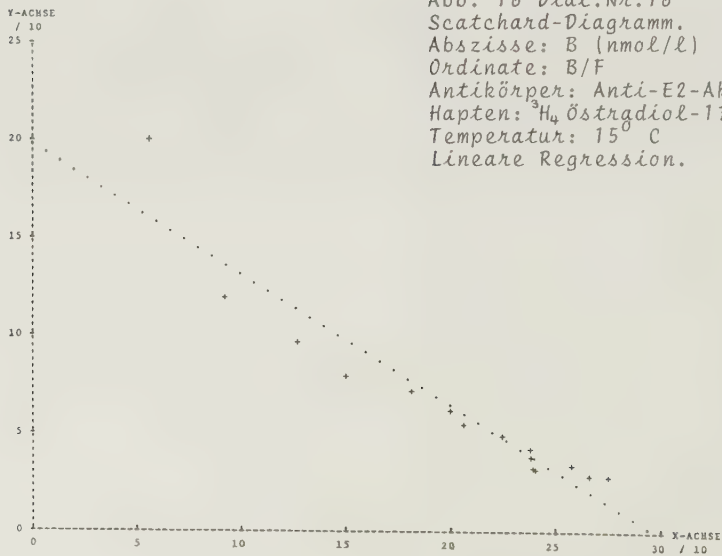
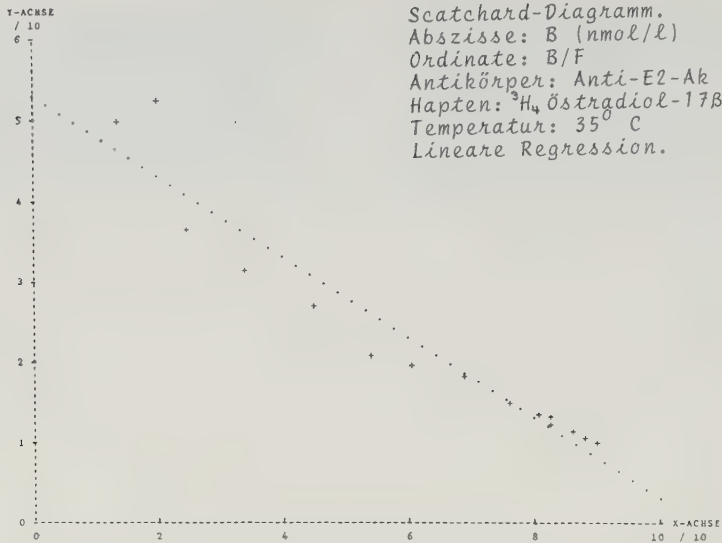
288

289

290

291

292



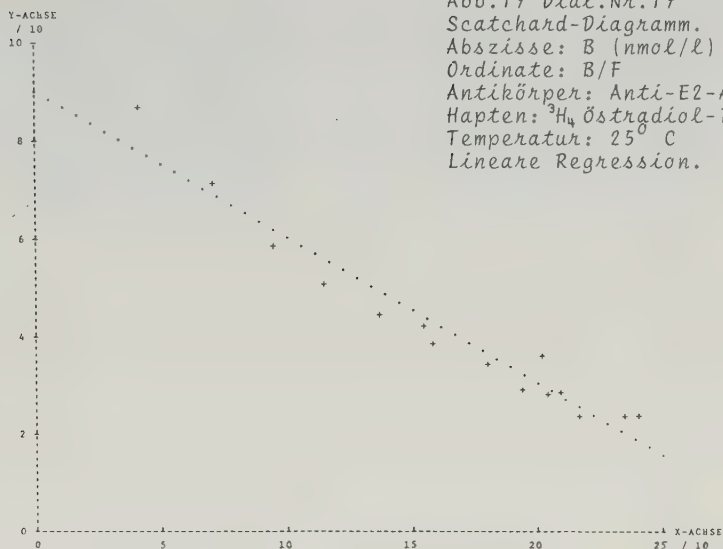


Abb. 17 Dial. Nr. 17
Scatchard-Diagramm.
Abszisse: B (nmol/l)
Ordinate: B/F
Antikörper: Anti-E2-Ak F2
Hapten: $^3\text{H}_4$ Östradiol-17 β
Temperatur: 25 $^\circ$ C
Lineare Regression.

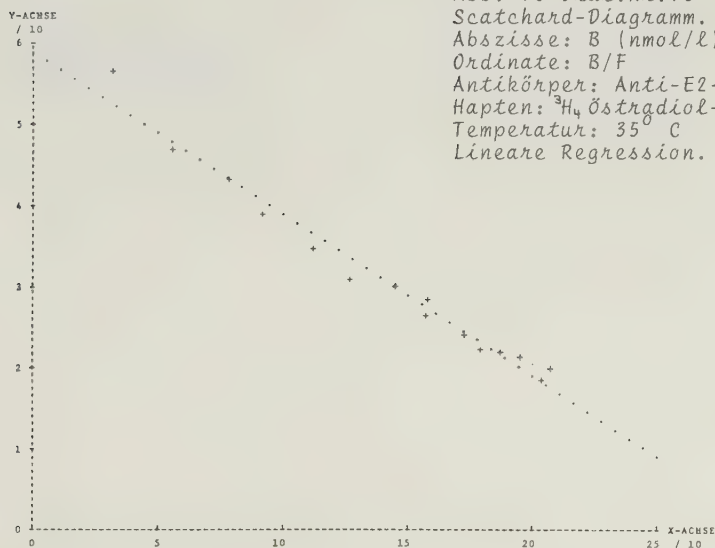


Abb. 18 Dial. Nr. 18
Scatchard-Diagramm.
Abszisse: B (nmol/l)
Ordinate: B/F
Antikörper: Anti-E2-Ak F2
Hapten: $^3\text{H}_4$ Östradiol-17 β
Temperatur: 35 $^\circ$ C
Lineare Regression.

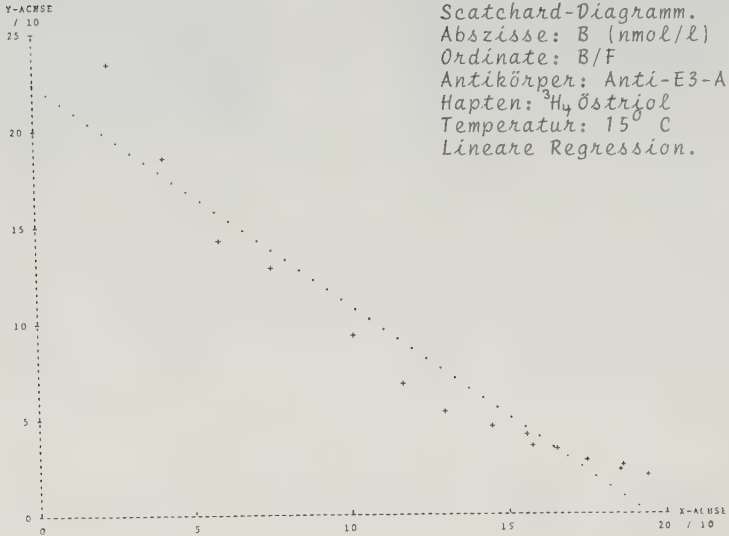


Abb. 19 Dial.Nr.19
Scatchard-Diagramm.
Abszisse: B (nmol/l)
Ordinate: B/F
Antikörper: Anti-E3-Ak J2
Hapten: $^3\text{H}_4$ Östrogen
Temperatur: 15°C
Lineare Regression.

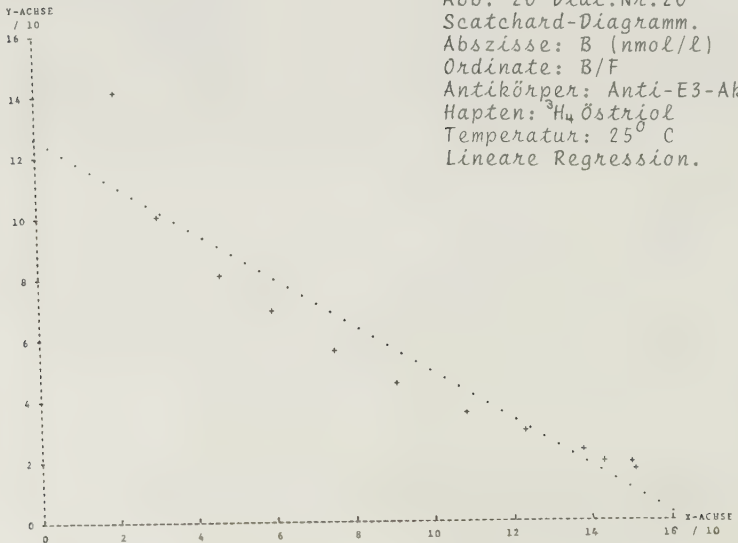


Abb. 20 Dial.Nr.20
Scatchard-Diagramm.
Abszisse: B (nmol/l)
Ordinate: B/F
Antikörper: Anti-E3-Ak J2
Hapten: $^3\text{H}_4$ Östrogen
Temperatur: 25°C
Lineare Regression.

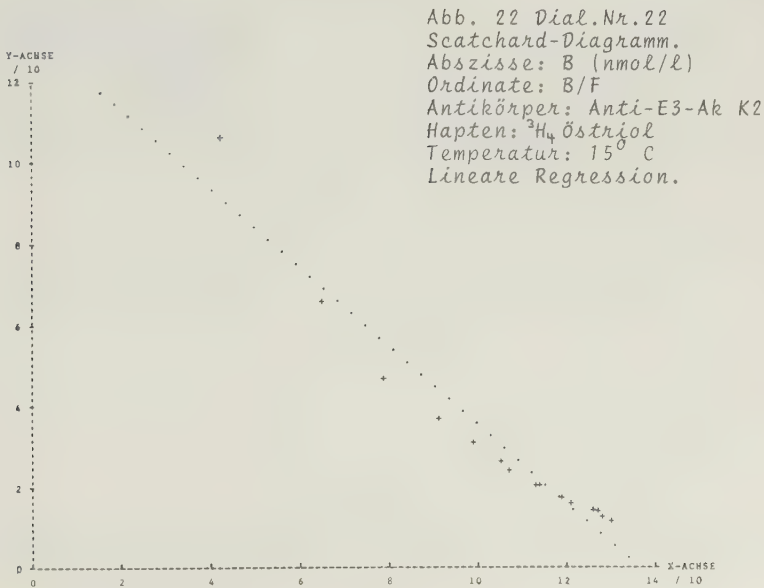
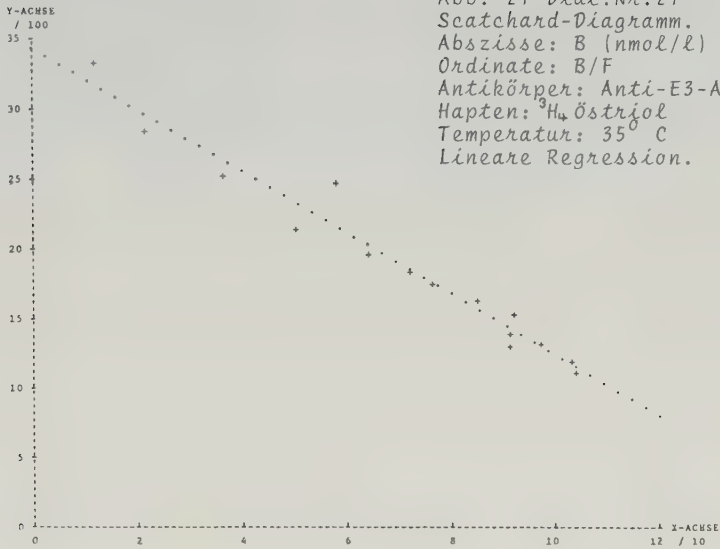


Abb. 23 Dial.Nr.23
Scatchard-Diagramm.
Abszisse: B (nmol/l)
Ordinate: B/F
Antikörper: Anti-E3-Ak K2
Hapten: $^3\text{H}_4$ Östrial
Temperatur: 25° C
Lineare Regression.

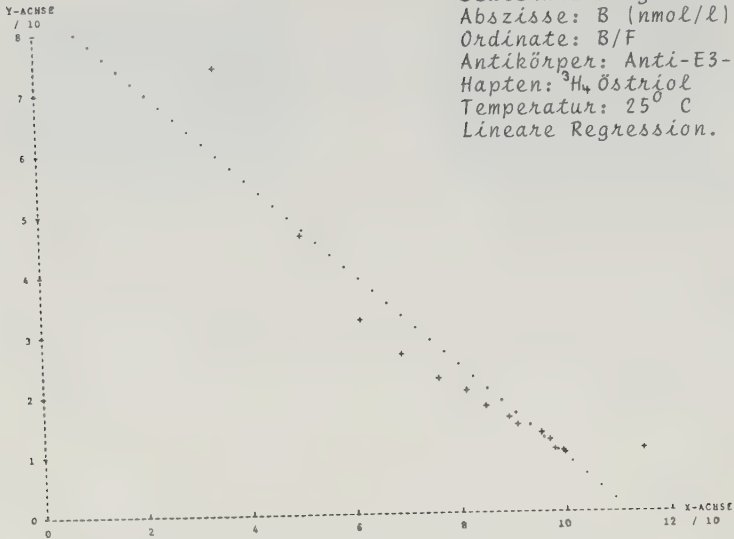
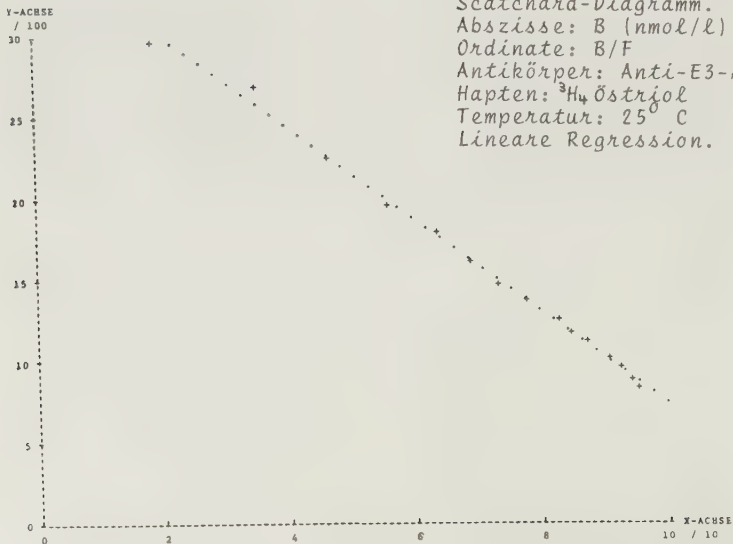


Abb. 24 Dial.Nr.24
Scatchard-Diagramm.
Abszisse: B (nmol/l)
Ordinate: B/F
Antikörper: Anti-E3-Ak K2
Hapten: $^3\text{H}_4$ Östrial
Temperatur: 25° C
Lineare Regression.



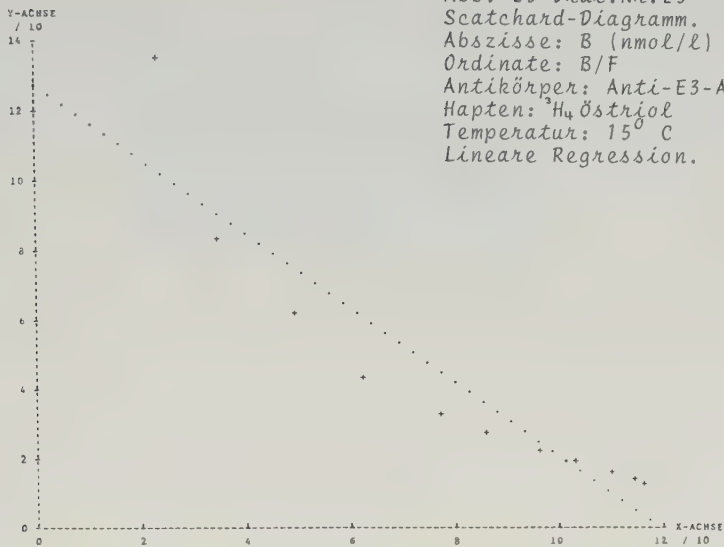


Abb. 25 Dial.Nr.25
Scatchard-Diagramm.
Abszisse: B (nmol/l)
Ordinate: B/F
Antikörper: Anti-E3-Ak H2
Hapten: $^3\text{H}_4$ Östrial
Temperatur: 15° C
Lineare Regression.

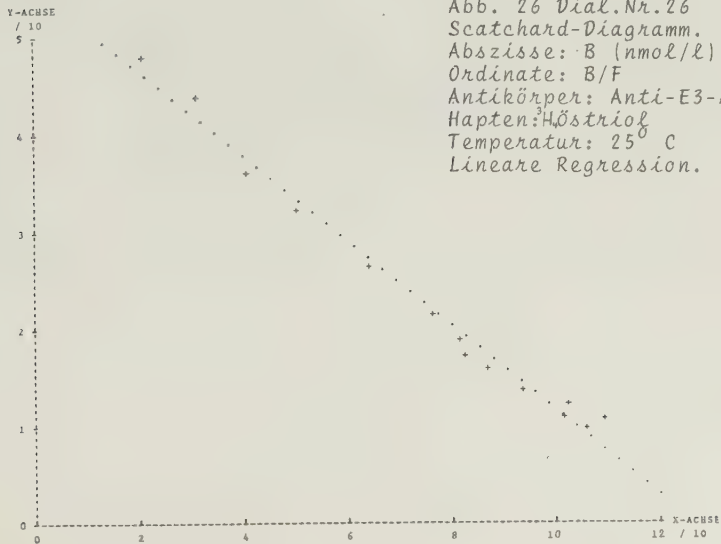
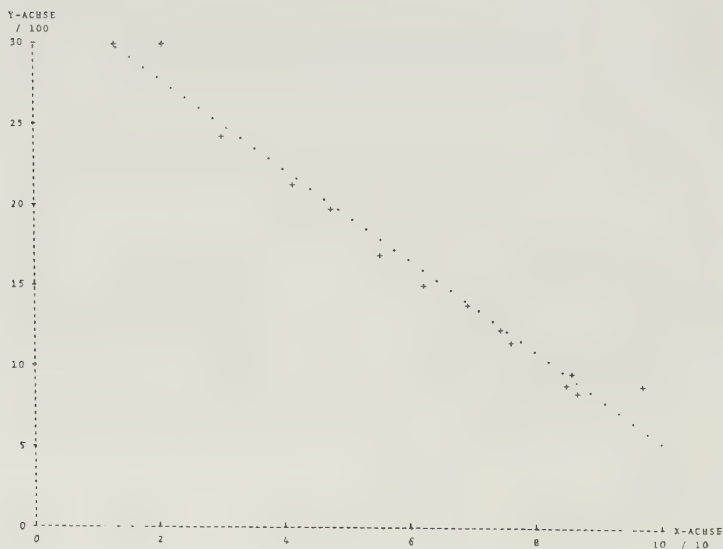


Abb. 26 Dial.Nr.26
Scatchard-Diagramm.
Abszisse: B (nmol/l)
Ordinate: B/F
Antikörper: Anti-E3-Ak H2
Hapten: $^3\text{H}_4$ Östrial
Temperatur: 25° C
Lineare Regression.

Abb. 27 Dial.Nr.27
 Scatchard-Diagramm.
 Abzisse: B (nmol/l)
 Ordinate: B/F
 Antikörper: Anti-E3-Ak H2
 Hapten: $^3\text{H}_4$ Östrogen
 Temperatur: 35°C
 Lineare Regression.



Anhang 3, Abb. 1 - 9: SIPS HALL DIAGRAMME MIT LINEARER REGRESSION

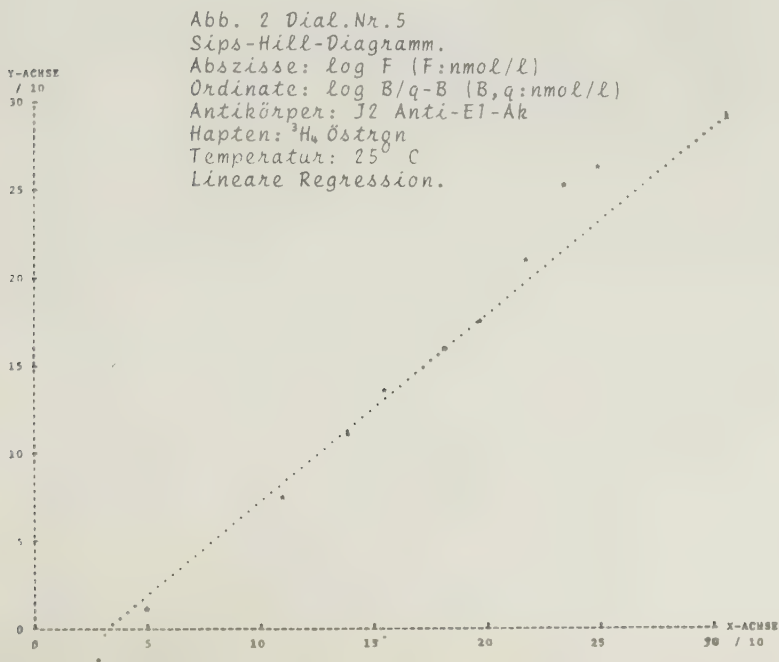
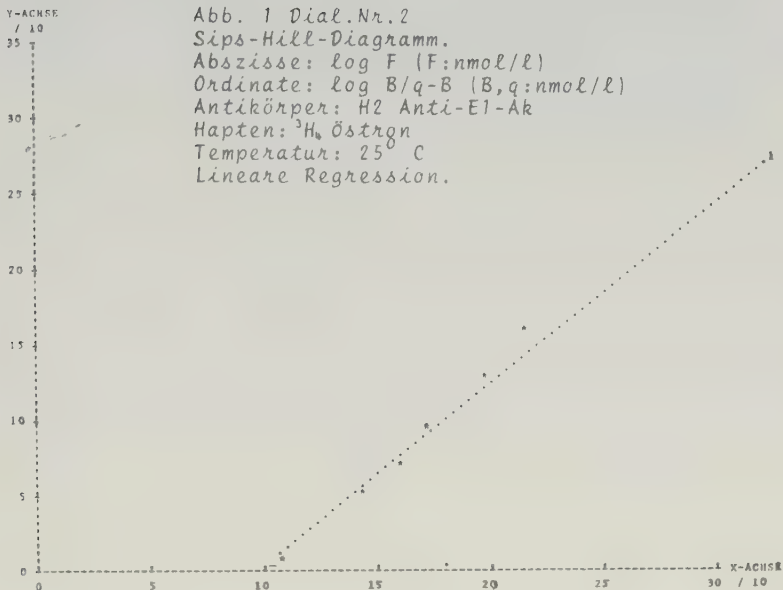


Abb. 3 Dial.Nr.8

Sips-Hill-Diagramm.

Abszisse: $\log F$ ($F: \text{nmol/l}$)

Ordinate: $\log B/q-B$ ($B, q: \text{nmol/l}$)

Antikörper: K2 Anti-E1-Ak

Hapten: $^3\text{H}_4$ Östrgn

Temperatur: 25°C

Lineare Regression.

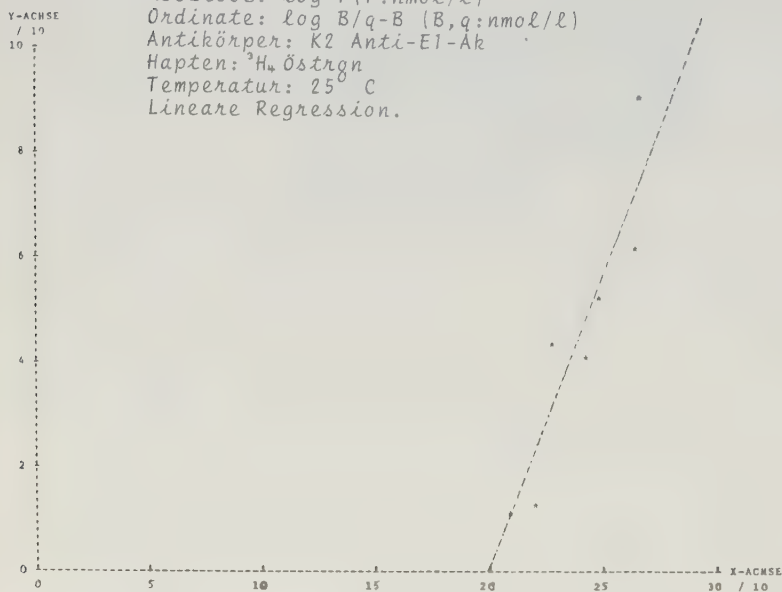


Abb. 4 Dial.Nr.11

Sips-Hill-Diagramm.

Abszisse: $\log F$ ($F: \text{nmol/l}$)

Ordinate: $\log B/q-B$ ($B, q: \text{nmol/l}$)

Antikörper: D2 Anti-E2-Ak

Hapten: $^3\text{H}_4$ Östradiol-17B

Temperatur: 25°C

Lineare Regression.

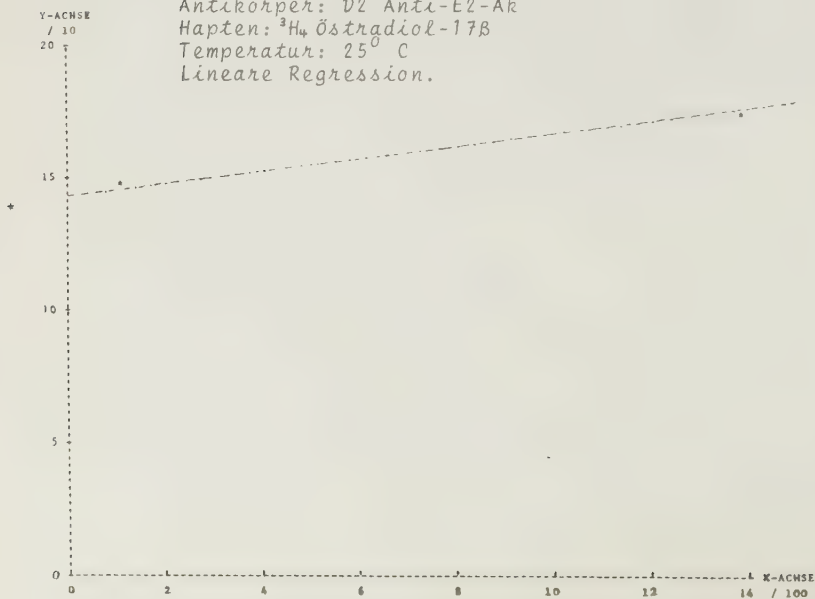


Abb. 5 Dial.Nr.14

Sips-Hill-Diagramm.

Abszisse: $\log F$ ($F: \text{nmol/l}$)

Ordinate: $\log B/q-B$ ($B, q: \text{nmol/l}$)

Antikörper: E2 Anti-E2-Ak

Hapten: $^3\text{H}_\alpha$ Östradiol-17 β

Temperatur: 25 $^\circ$ C

Lineare Regression.

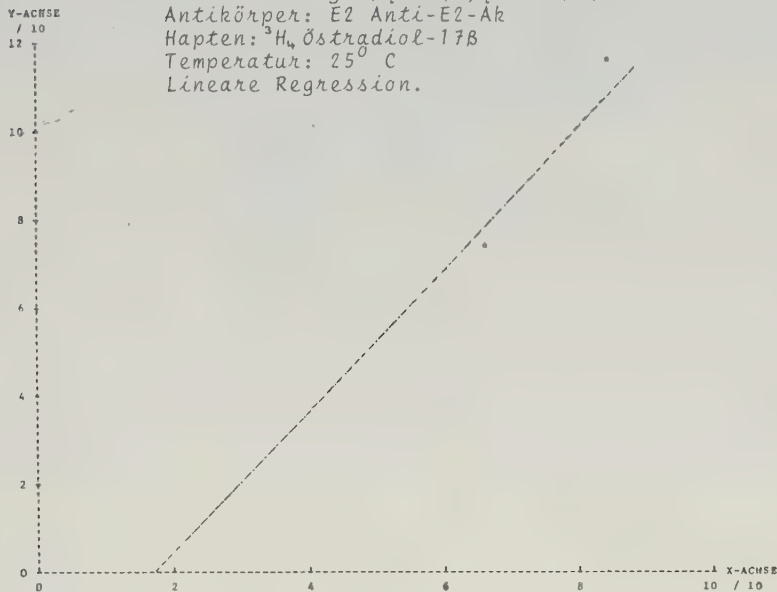


Abb. 6 Dial.Nr.17

Sips-Hill-Diagramm.

Abszisse: $\log F$ ($F: \text{nmol/l}$)

Ordinate: $\log B/q-B$ ($B, q: \text{nmol/l}$)

Antikörper: F2 Anti-E2-Ak

Hapten: $^3\text{H}_\alpha$ Östradiol-17 β

Temperatur: 25 $^\circ$ C

Lineare Regression.

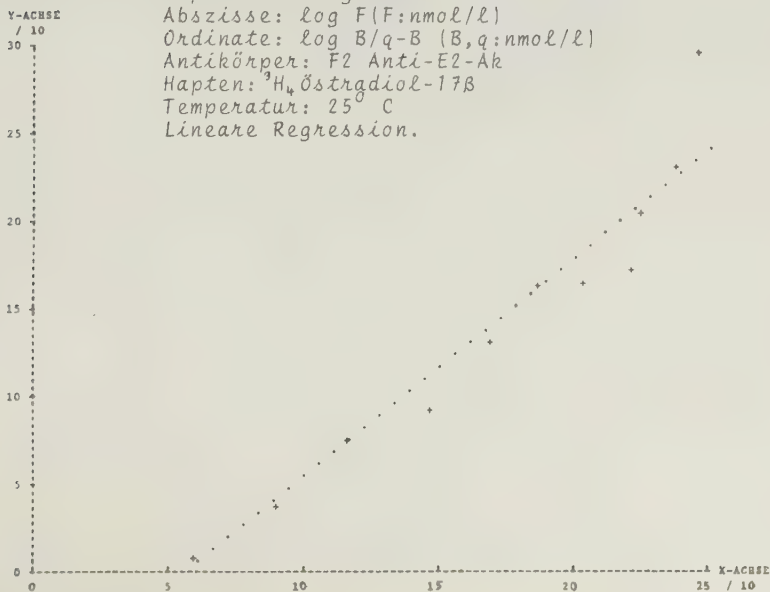


Abb. 7 Dial.Nr.20
Sips-Hill-Diagramm.
Abszisse: $\log F$ ($F: \text{nmol/l}$)
Ordinate: $\log B/q-B$ ($B-q: \text{nmol/l}$)
Antikörper: J2 Anti-E3-Ak
Hapten: $^3\text{H}_4$ Östrijol
Temperatur: 25°C
Lineare Regression.

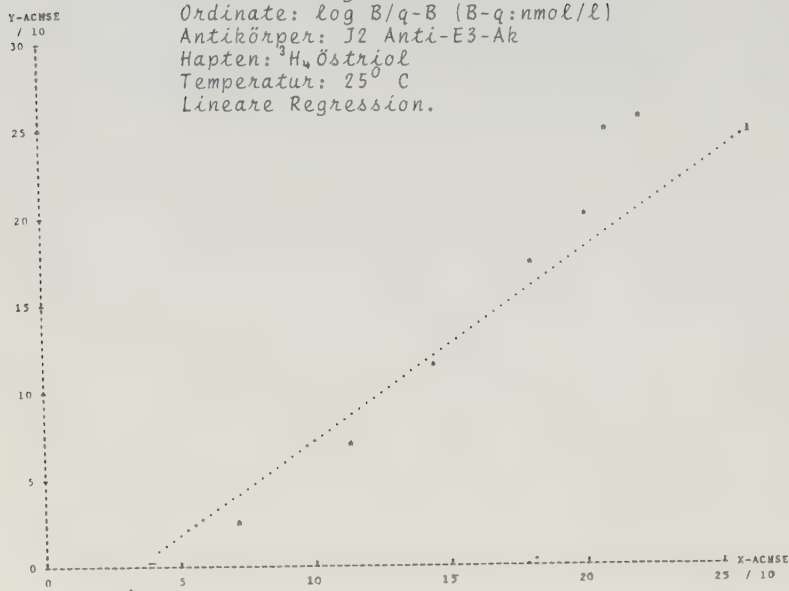


Abb. 8 Dial.Nr.23
Sips-Hill-Diagramm.
Abszisse: $\log F$ ($F: \text{nmol/l}$)
Ordinate: $\log B/q-B$ ($B,q: \text{nmol/l}$)
Antikörper: K2 Anti-E3-Ak
Hapten: $^3\text{H}_4$ Östrijol
Temperatur: 25°C
Lineare Regression.

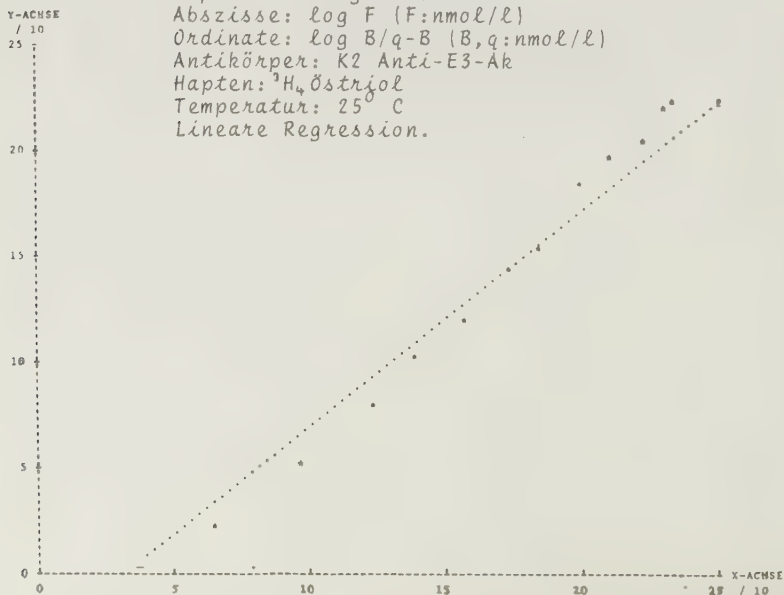
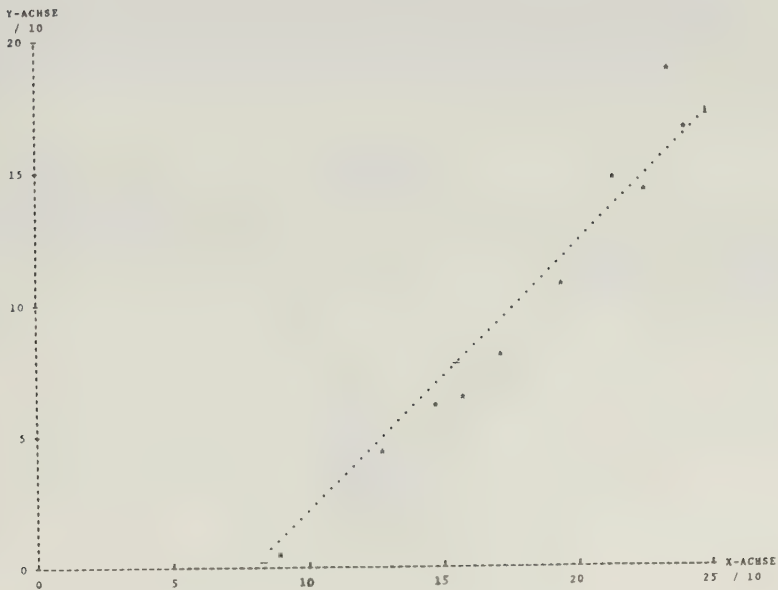


Abb. 9 Dial.Nr.26
Sips-Hill-Diagramm.
Abszisse: $\log F$ ($F: \text{nmol/l}$)
Ordinate: $\log B/q-B$ ($B, q: \text{nmol/l}$)
Antikörper: H2 Anti-E3-Ak
Hapten: ^3H -Östrjol
Temperatur: 25°C
Lineare Regression.



Anhang 4: Abb. 1 - 12: EISENTHAL UND CORNISH-BOWDEN DIAGRAMME

Abb. 1 Dial.Nr.2

Eisenthal- u. Cornish-Bowden-Diagramm.

Antikörper: Anti-E1-Ak H2

Hapten: $^3\text{H}_4$ Östrgn

Temperatur: 25° C

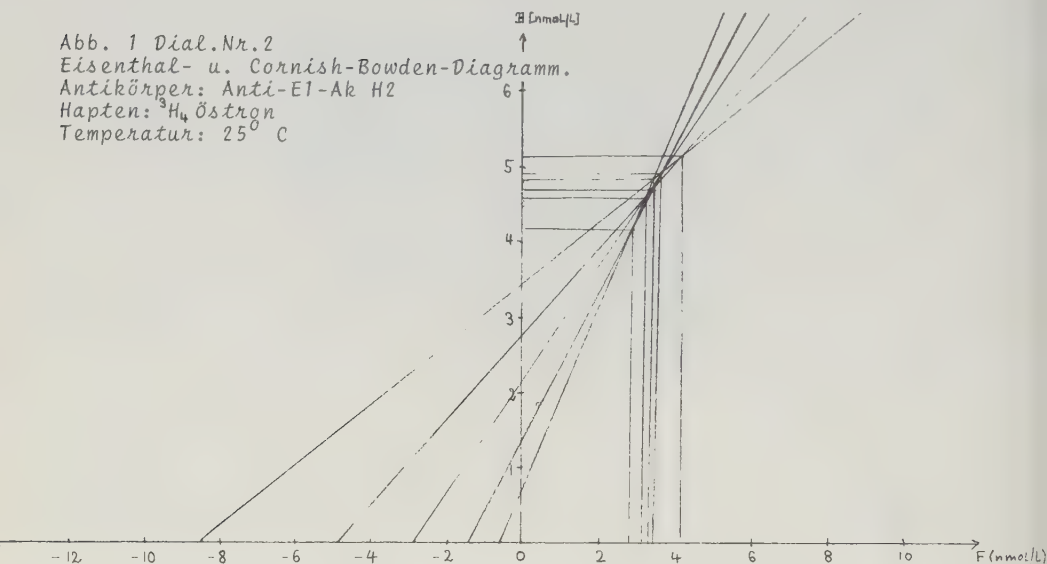


Abb. 2 Dial.Nr.5

Eisenthal- u. Cornish-Bowden-Diagramm.

Antikörper: Anti-E1-Ak J2

Hapten: $^3\text{H}_4$ Östrgn

Temperatur: 25° C

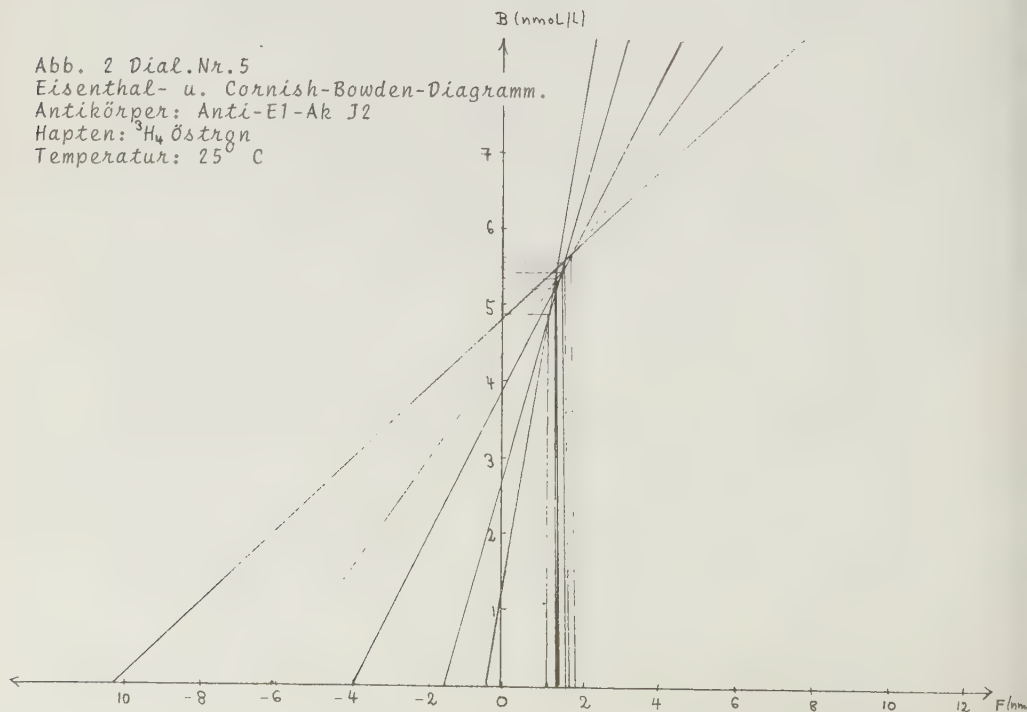


Abb. 3 Dial.Nr.8
Eisenthal- u. Cornish-Bowden-Diagramm.
Antikörper: Anti-E1-Ak K2
Hapten: $^3\text{H}_4$ Östron
Temperatur: 25°C

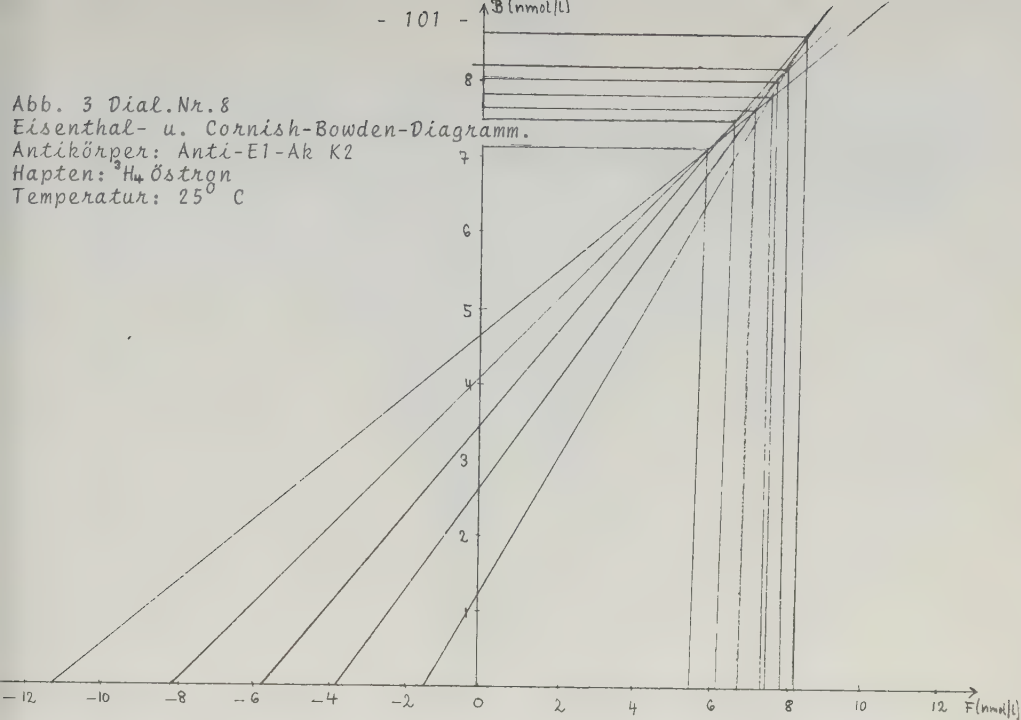


Abb. 4 Dial.Nr.11
Eisenthal- u. Cornish-Bowden-Diagramm.
Antikörper: Anti-E2-Ak D2
Hapten: $^3\text{H}_4$ Östradiol-17 β
Temperatur: 25°C

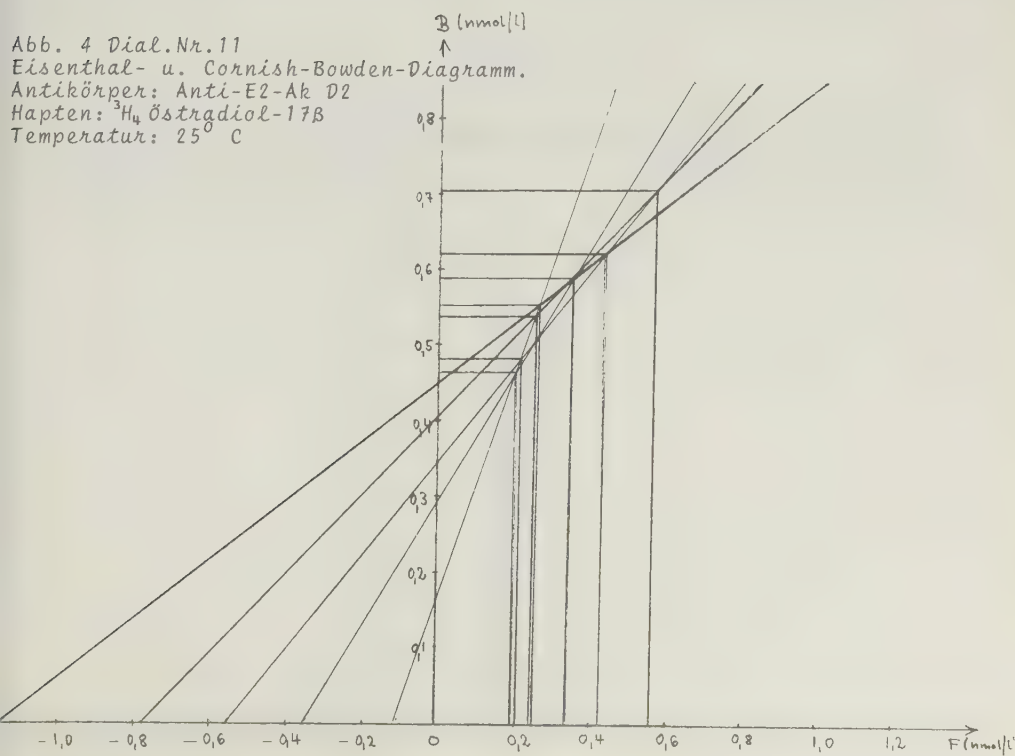


Abb. 5 Dial.Nr.14

Eisenthal- u. Cornish-Bowden-Diagramm.

Antikörper: Anti-E2-Ak E2

Hapten: $^3\text{H}_4$ Östradiol-17 β

Temperatur: 25 $^\circ$ C

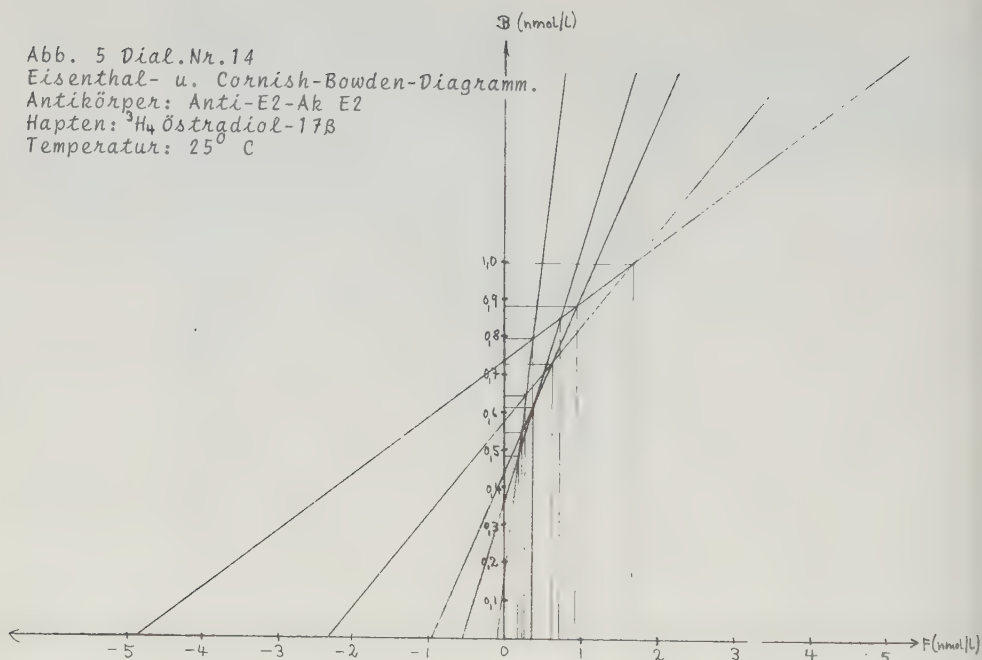


Abb. 6 Dial.Nr.17

Eisenthal- u. Cornish-Bowden-Diagramm.

Antikörper: Anti-E2-Ak F2

Hapten: $^3\text{H}_4$ Östradiol-17 β

Temperatur: 25 $^\circ$ C

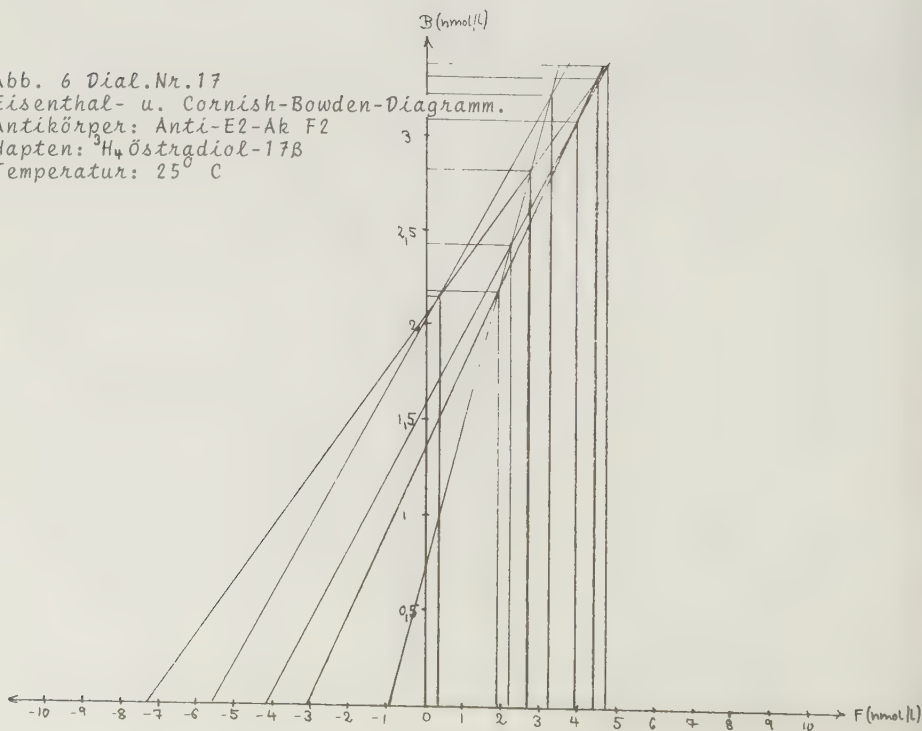


Abb. 7 Dial.Nr.20
Eisenthal- u. Cornish-Bowden-Diagramm.
Antikörper: Anti-E3-Ak J2
Hapten: $^3\text{H}_4$ Östrijol
Temperatur: 25° C

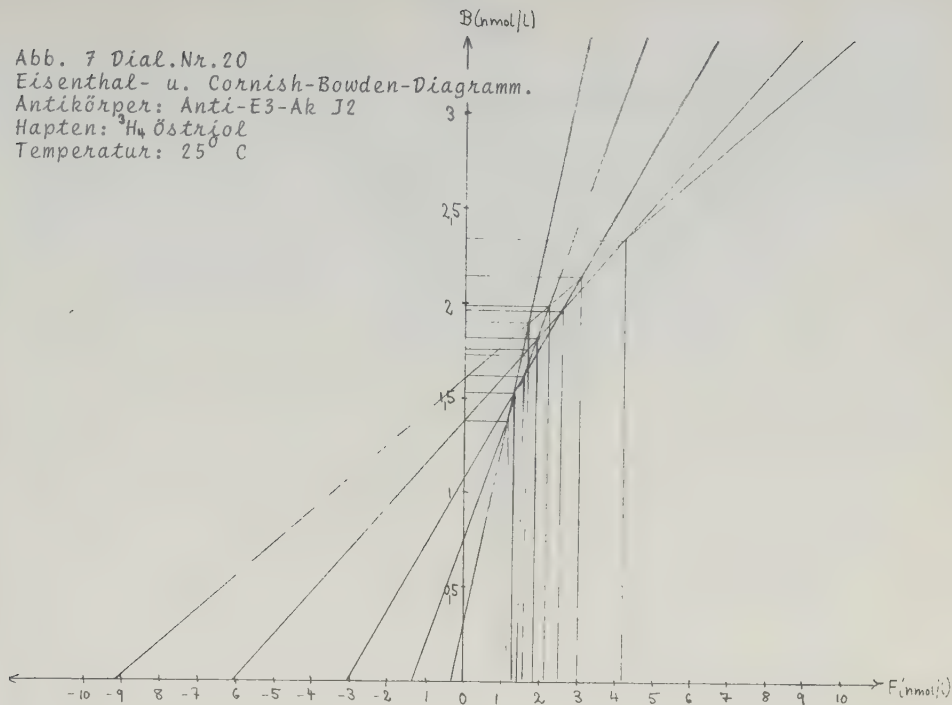
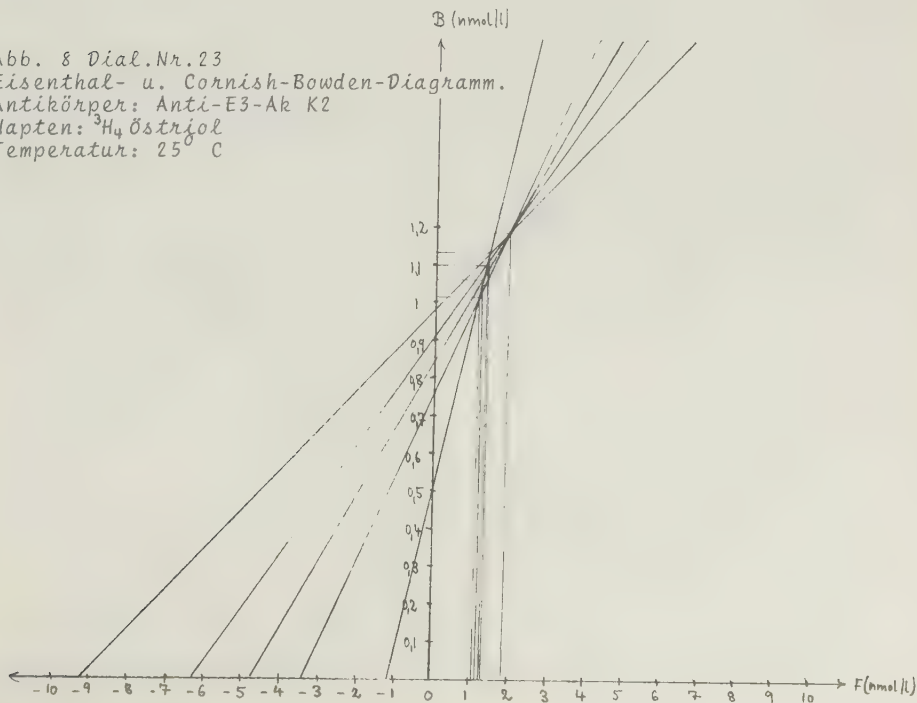
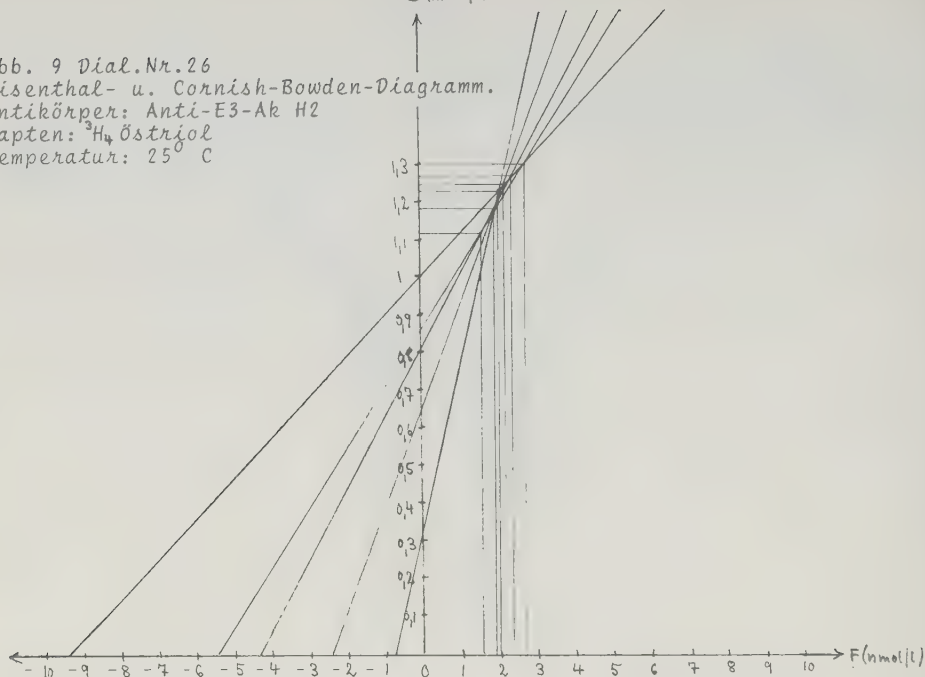


Abb. 8 Dial.Nr.23
Eisenthal- u. Cornish-Bowden-Diagramm.
Antikörper: Anti-E3-Ak K2
Hapten: $^3\text{H}_4$ Östrijol
Temperatur: 25° C



- 104 -
B (nmol/L)

Abb. 9 Dial.Nr.26
Eisenthal- u. Cornish-Bowden-Diagramm.
Antikörper: Anti-E3-Ak H2
Hapten: $^3\text{H}_4$ Östron
Temperatur: 25° C



B (nmol/L)

Abb.10 Dial.Nr.3
Eisenthal- u. Cornish-Bowden-Diagramm.
Antikörper: Anti-E2-Ak H2
Hapten: $^3\text{H}_4$ Östron
Temperatur: 35° C

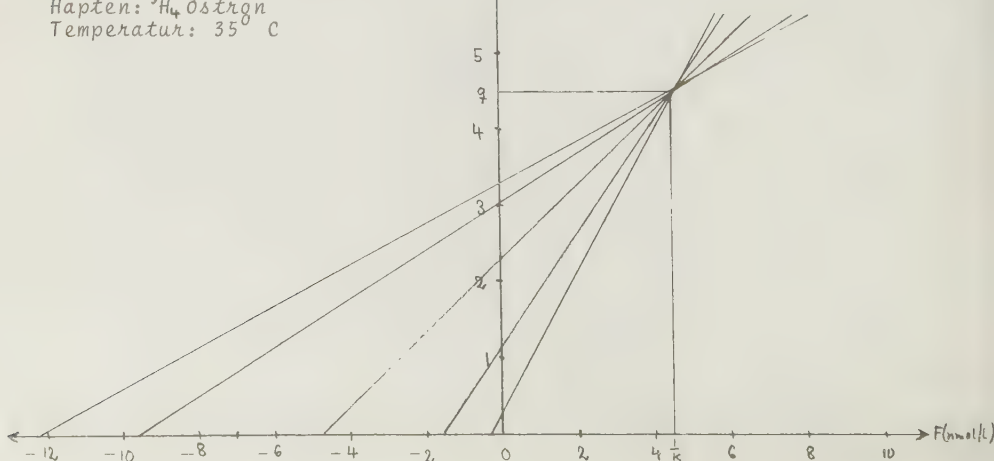


Abb. 11 Dial.Nr.18

Eisenthal- u. Cornish-Bowden-Diagramm.

Antikörper: Anti-E2-Ak F2

Hapten: ^3H -Östradiol-17 β

Temperatur: 35 $^{\circ}$ C

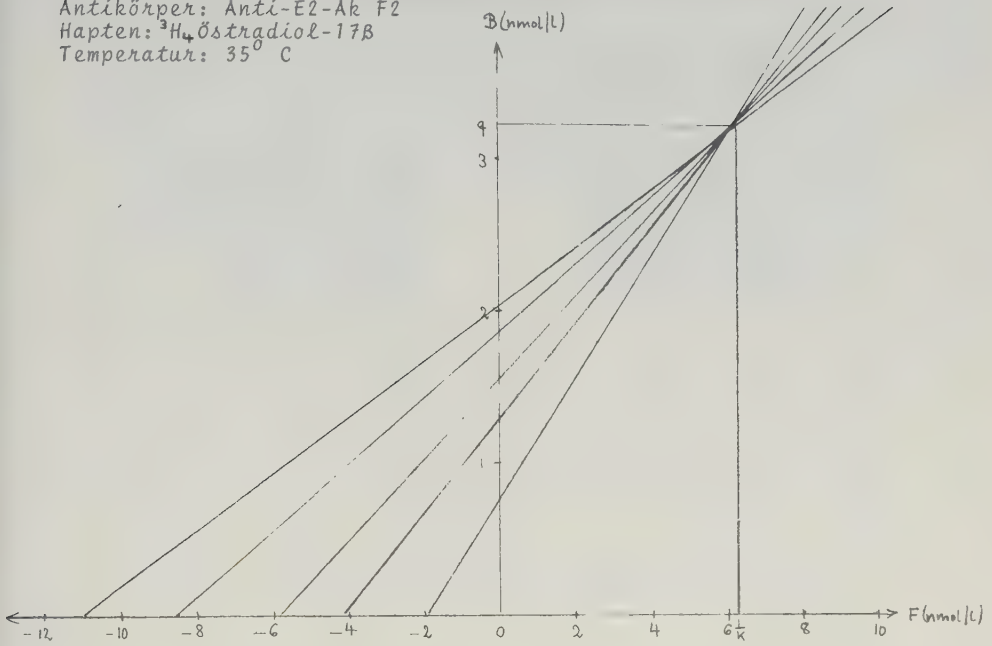


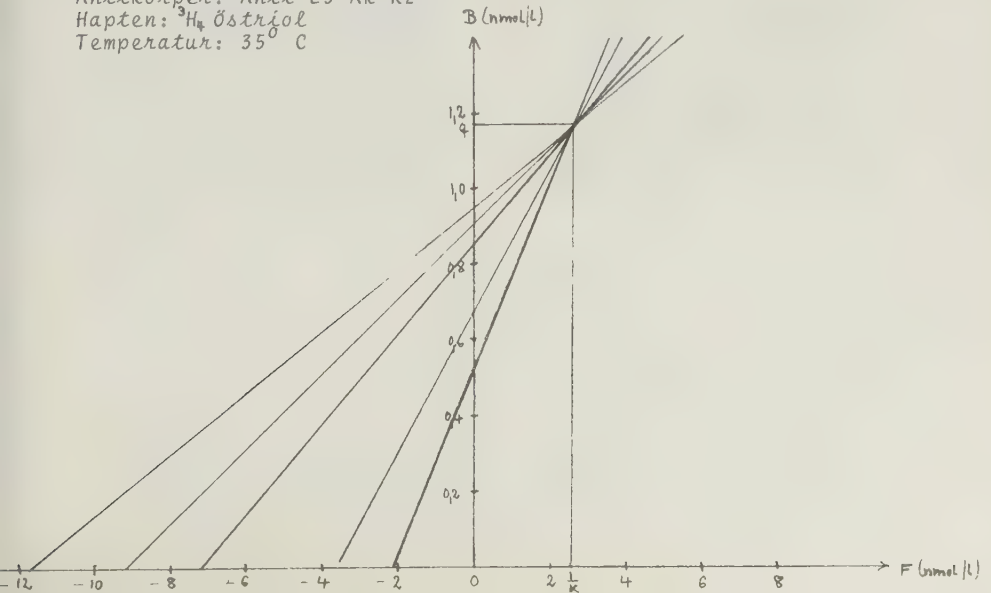
Abb. 12 Dial.Nr.24

Eisenthal- u. Cornish-Bowden-Diagramm.

Antikörper: Anti-E3-Ak K2

Hapten: ^3H -Östradiol

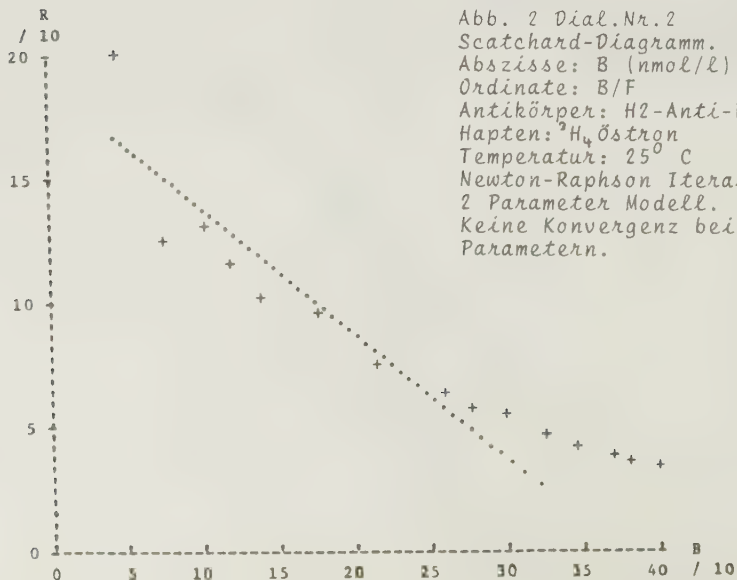
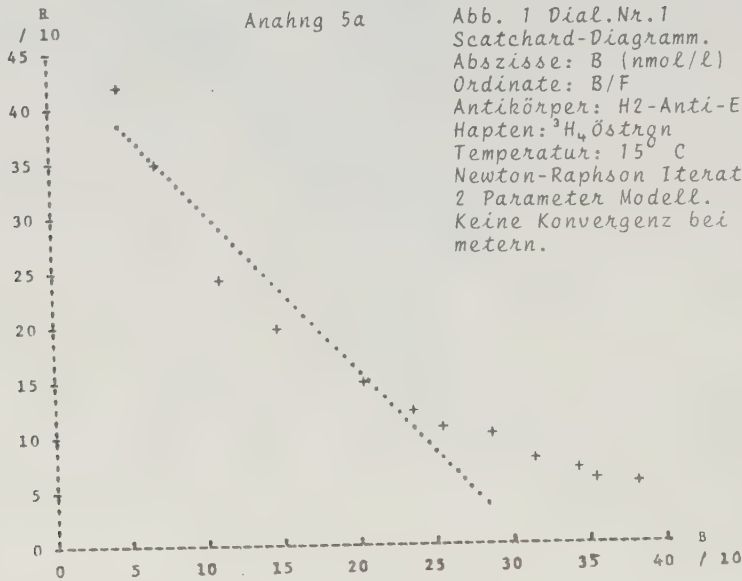
Temperatur: 35 $^{\circ}$ C

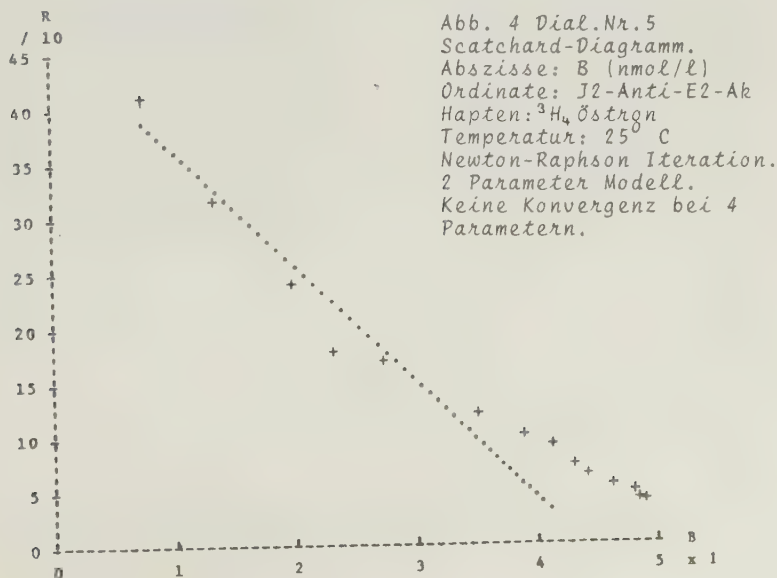
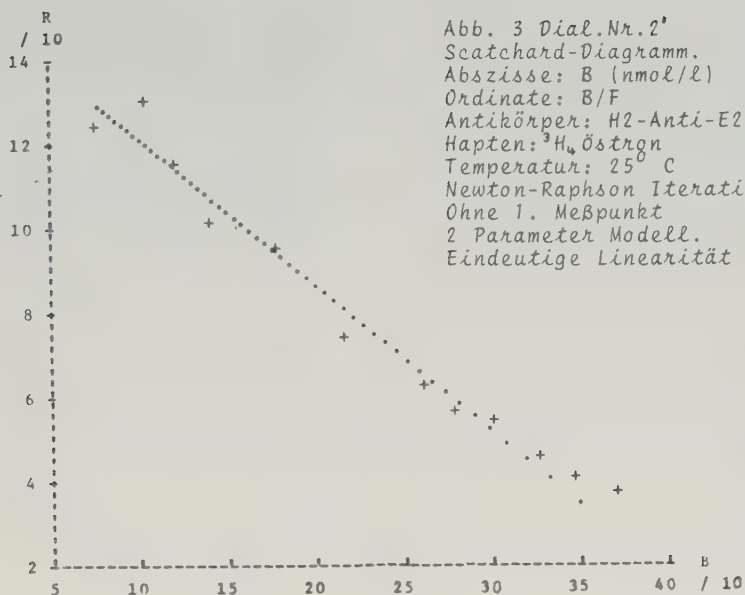


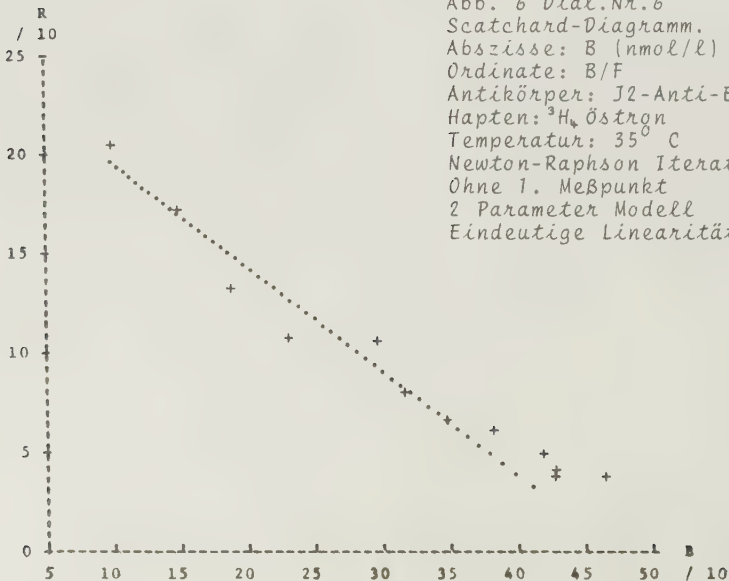
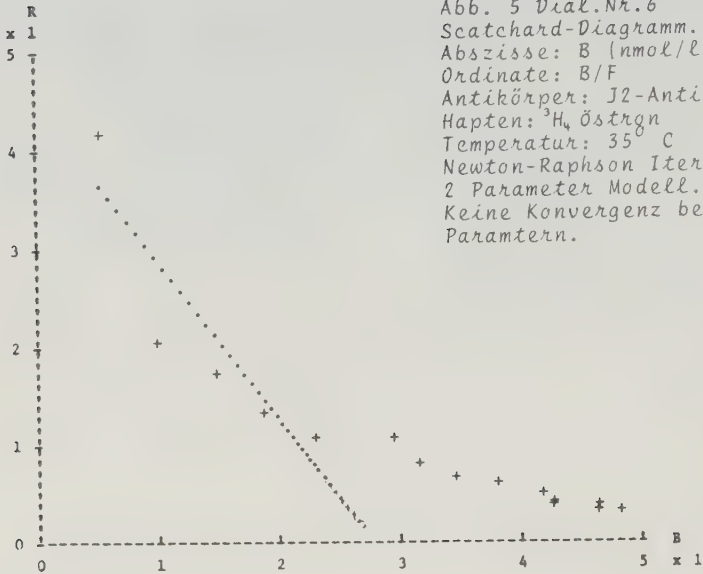
Anhang 4: SCATCHARD DIAGRAMME MIT LINEARER UND NICHTLINEARER REGRESSION

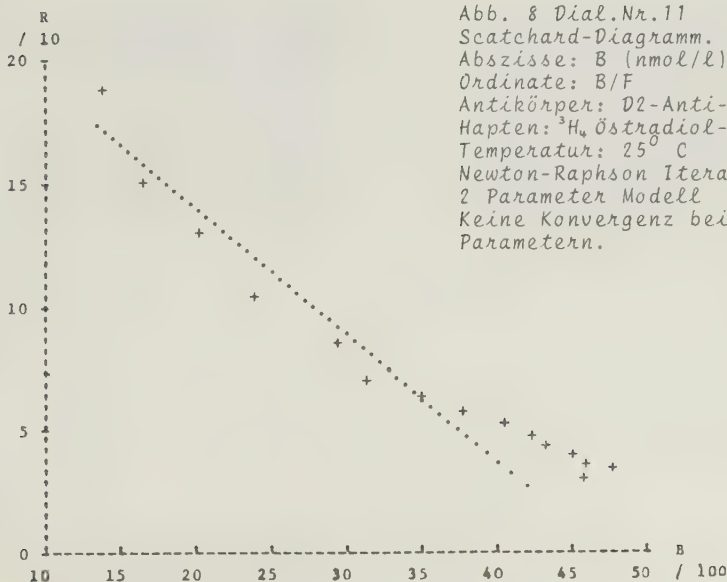
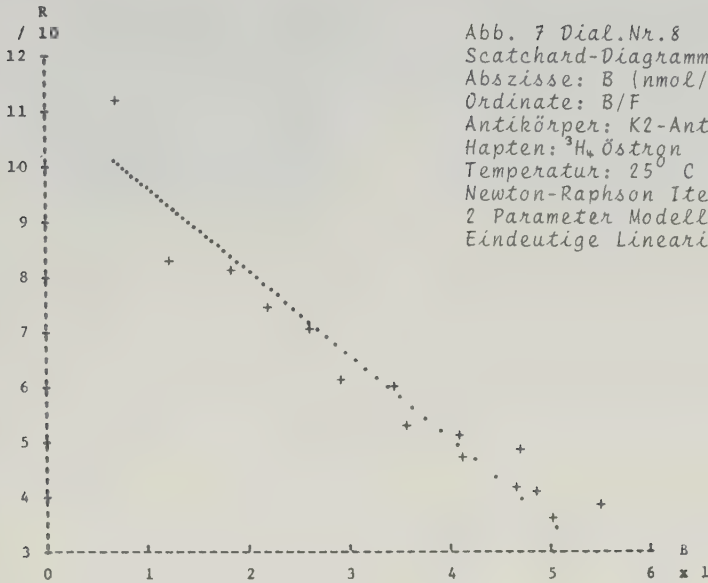
Anhang 5a, Abb. 1-18: Newton Raphson Diagramme

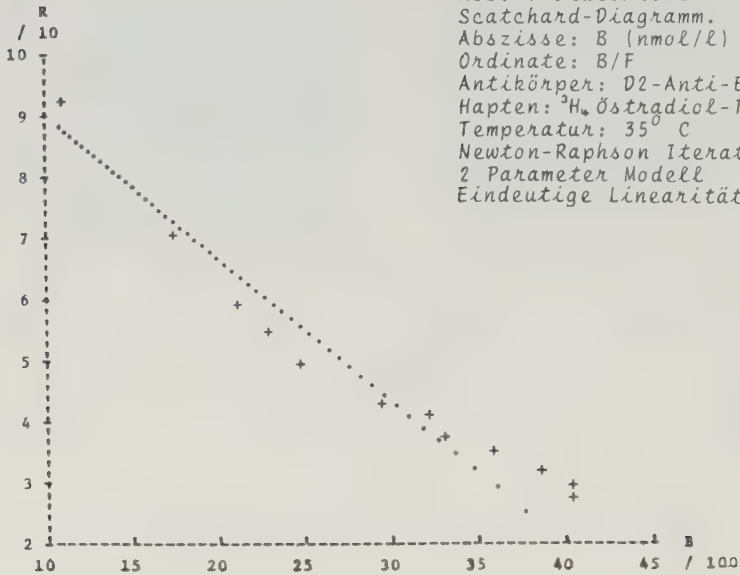
Anhang 5b, Abb.19-25: Tschebycheff Diagramme

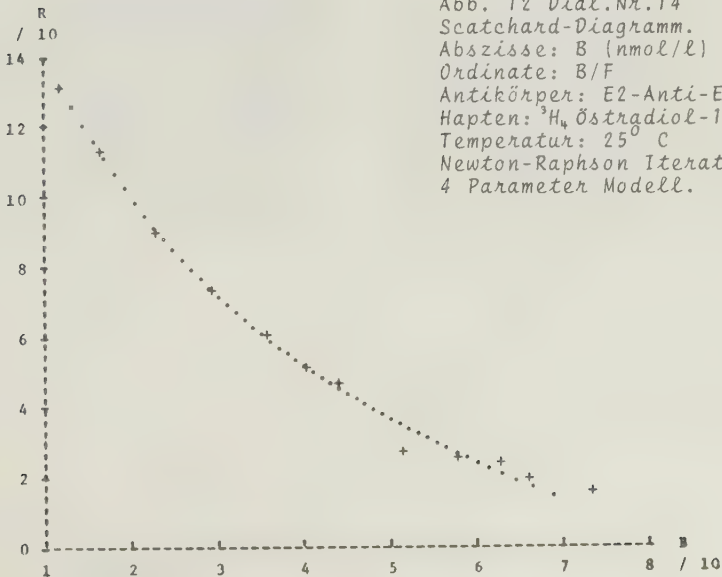
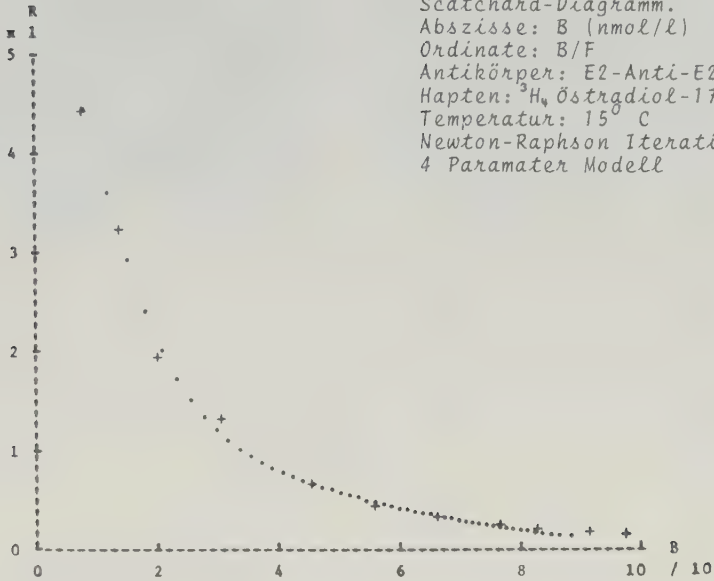












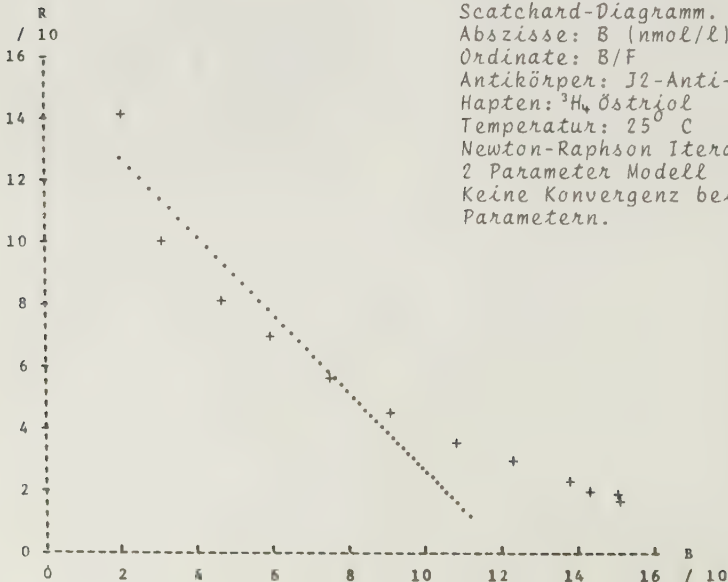
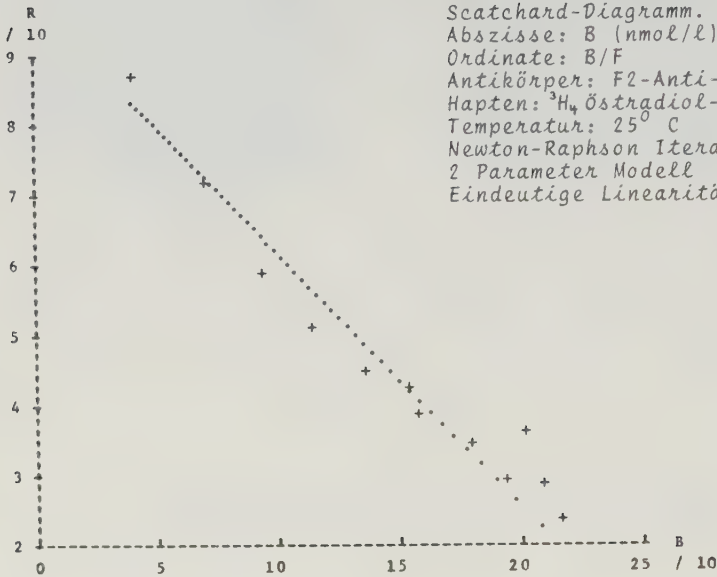


Abb. 15 Dial.Nr.23
 Scatchard-Diagramm.
 Abszisse: B (nmol/l)
 Ordinate: B/F
 Antikörper: K2-Anti-E3-Ak
 Hapten: $^3\text{H}_4$ Östrijol
 Temperatur: 25° C
 Newton-Raphson Iteration.
 2 Parameter Modell

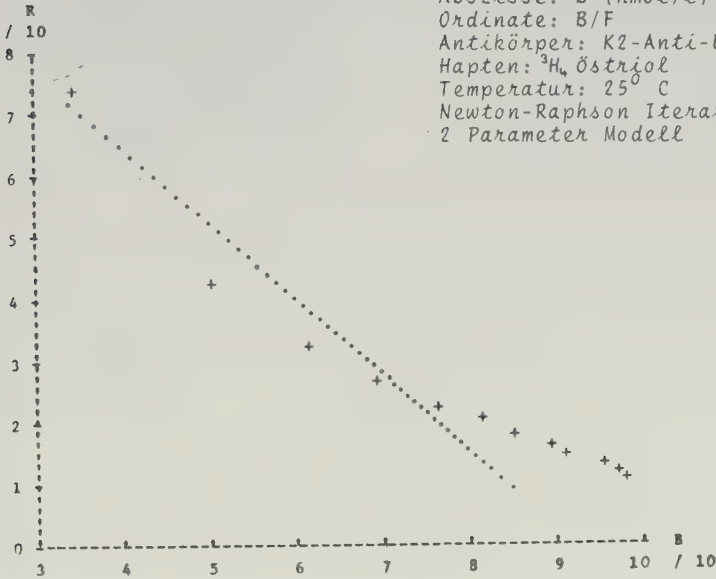
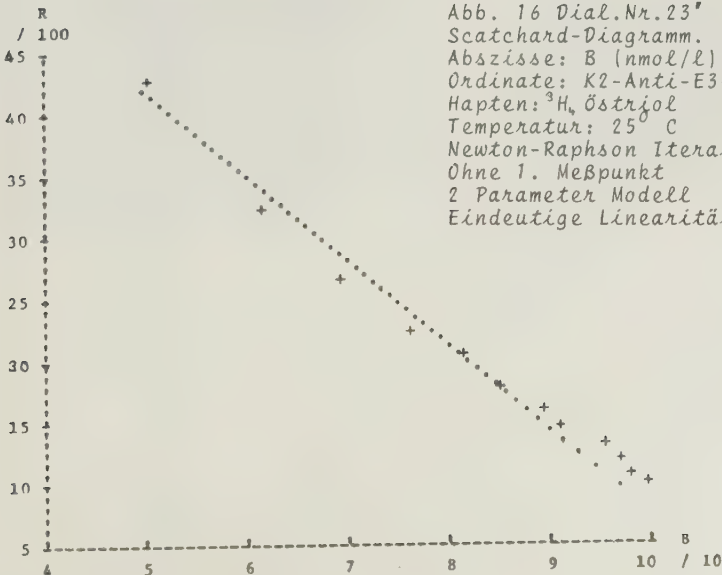
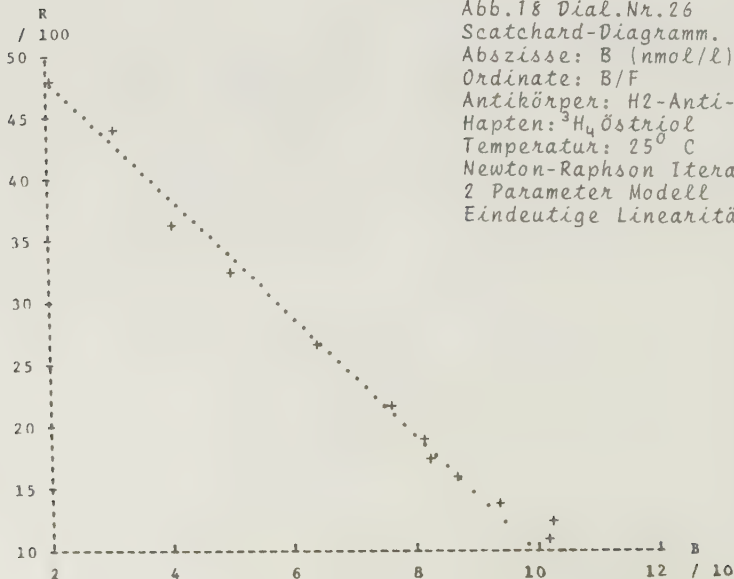
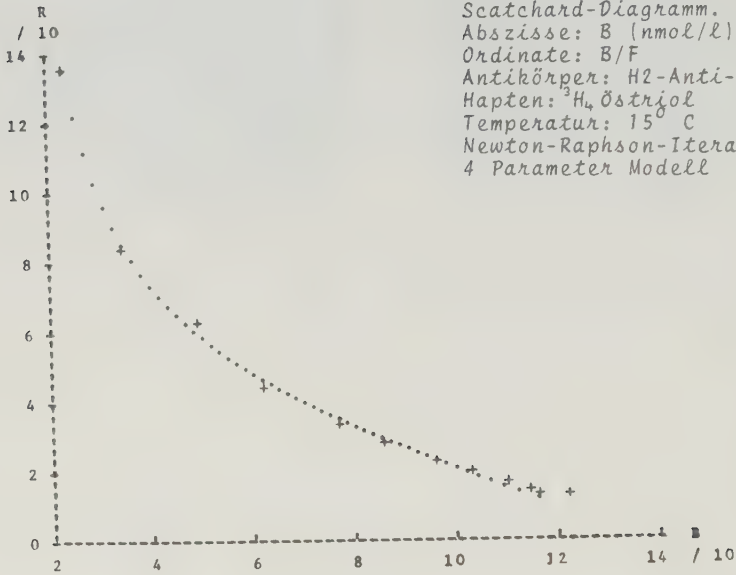
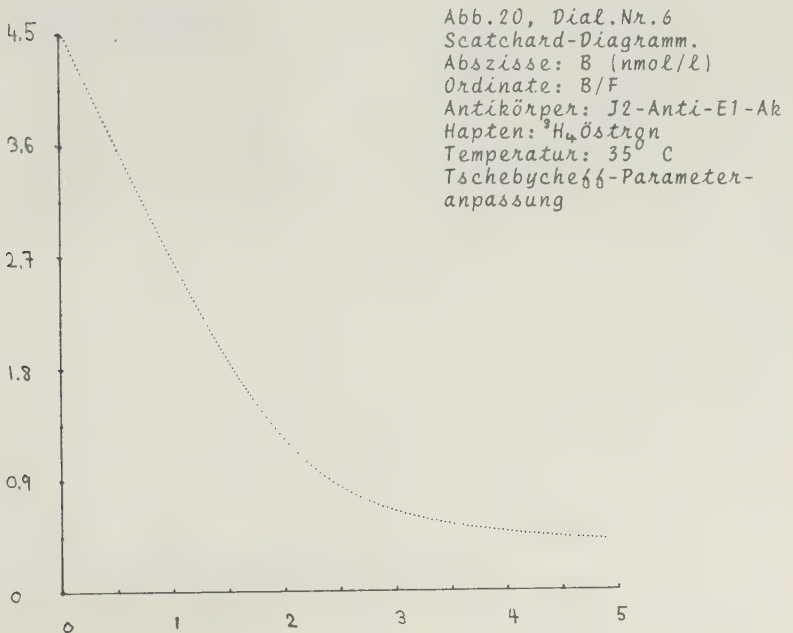
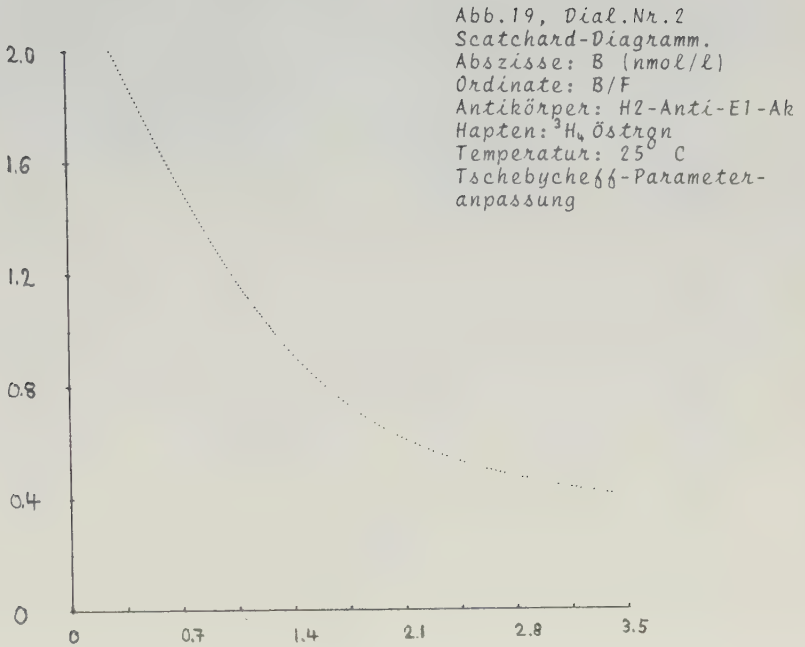


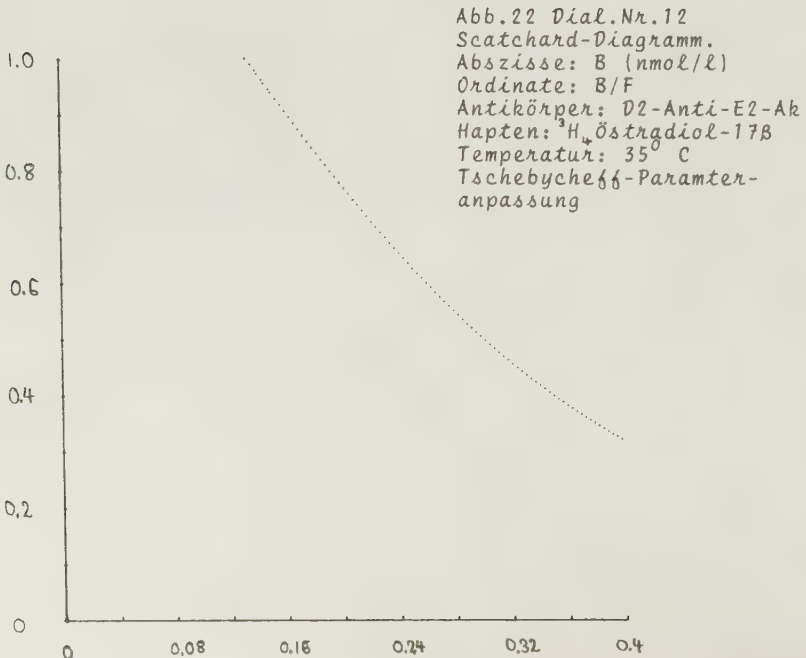
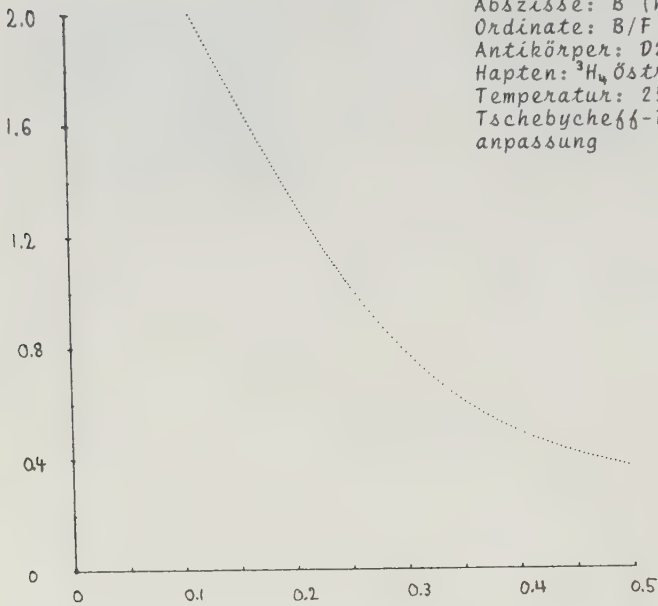
Abb. 16 Dial.Nr.23'
 Scatchard-Diagramm.
 Abszisse: B (nmol/l)
 Ordinate: K2-Anti-E3-Ak
 Hapten: $^3\text{H}_4$ Östrijol
 Temperatur: 25° C
 Newton-Raphson Iteration
 Ohne 1. Meßpunkt
 2 Parameter Modell
 Eindeutige Linearität





Anhang 5b





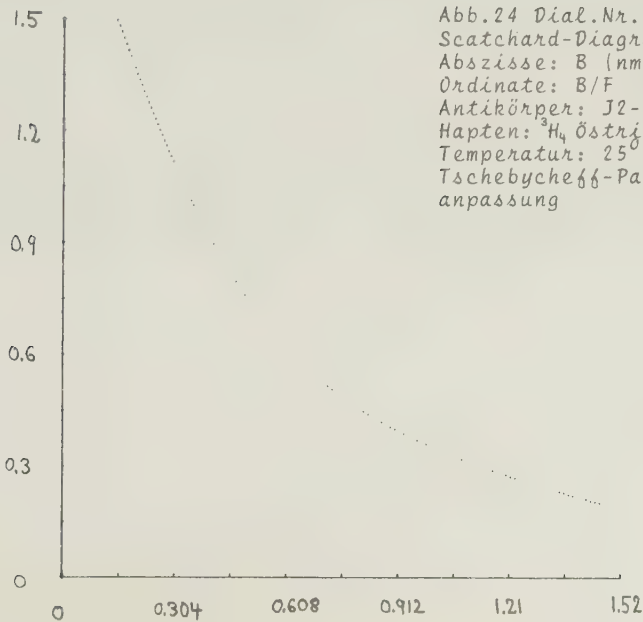
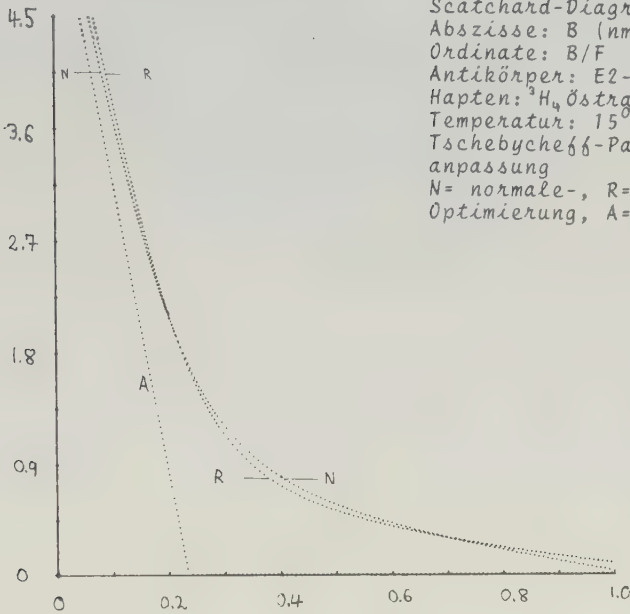
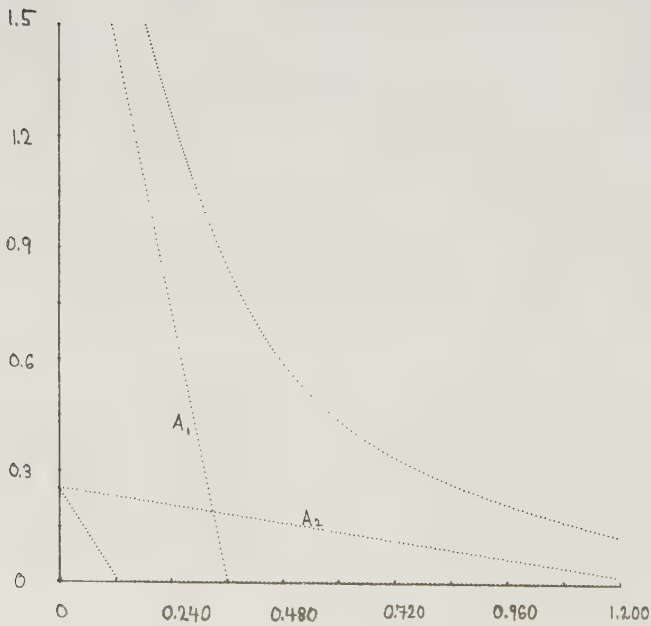


Abb. 25 Dial. Nr. 25
Scatchard-Diagramm.
Abszisse: B (nmol/l)
Ordinate: B/F
Antikörper: H2-Anti-E3-Ak
Hapten: 3H_4 Östrogen
Temperatur: $15^\circ C$
Tschebycheff-Parameteran-
passung
 A_1, A_2 : Asymptoten
der Bindungskurve



Anhang 6: Abb. 1 - 9: VAN'T HOFF DIAGRAMME MIT LINEARER REGRESSION

Abb. 1 Dial.Nr.1,2,3
Van't Hoff-Diagramm.
Abszisse: $1/T$ ($T: ^\circ K$)
Ordinate: $R \ln K$ ($R: \text{cal/mol}^\circ K; K: \text{l/mol}$)
Antikörper: Anti-E1-Ak H2
Hapten: 3H Östron
Lineare Regression.



Abb. 2 Dial.Nr.4,5,6

Van't Hoff-Diagramm.

Abszisse: $1/T$ ($T: K$)

Ordinate: $R \ln K$ ($R: \text{cal/mol}^{\circ}K; K: \text{l/mol}$)

Antikörper: Anti-E1-Ak J2

Hapten: ^{125}I -Östron

Lineare Regression.

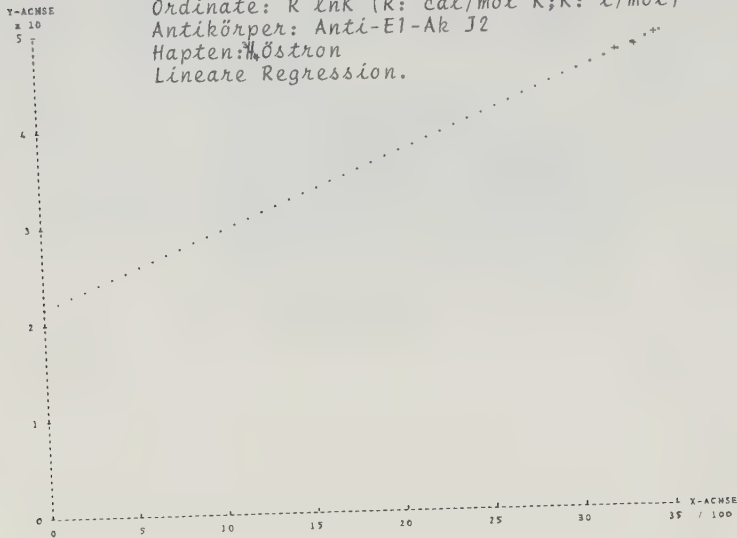


Abb. 3 Dial.Nr.7,8,9

Van't Hoff-Diagramm.

Abszisse: $1/T$ ($T: K$)

Ordinate: $R \ln K$ ($R: \text{cal/mol}^{\circ}K; K: \text{l/mol}$)

Antikörper: Anti-E1-Ak K2

Hapten: ^{125}I -Östron

Lineare Regression.

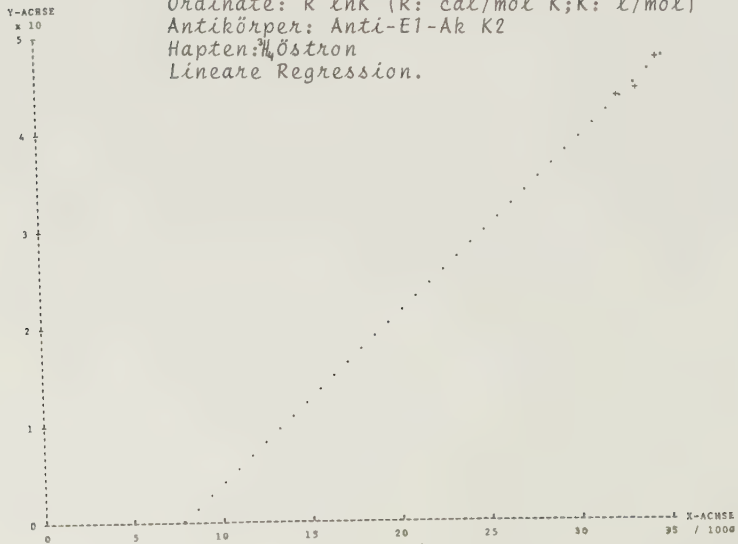


Abb. 4 Dial.Nr.10,11,12

Van't Hoff-Diagramm.

Abszisse: $1/T$ ($T: ^\circ K$)

Ordinate: $R \ln K$ ($R: \text{cal/mol}^\circ K; K: \text{l/mol}$)

Antikörper: Anti-E2-Ak D2

Hapten: 3H -Östradiol-17 β

Lineare Regression.

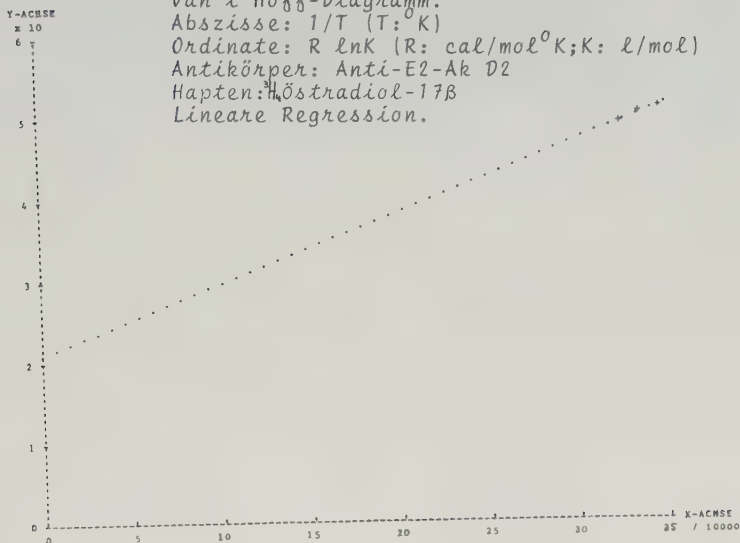


Abb. 5 Dial.Nr.13,14,15

Van't Hoff-Diagramm.

Abszisse: $1/T$ ($T: ^\circ K$)

Ordinate: $R \ln K$ ($R: \text{cal/mol}^\circ K; K: \text{l/mol}$)

Antikörper: Anti-E2-Ak E2

Hapten: 3H -Östradiol-17 β

Lineare Regression.

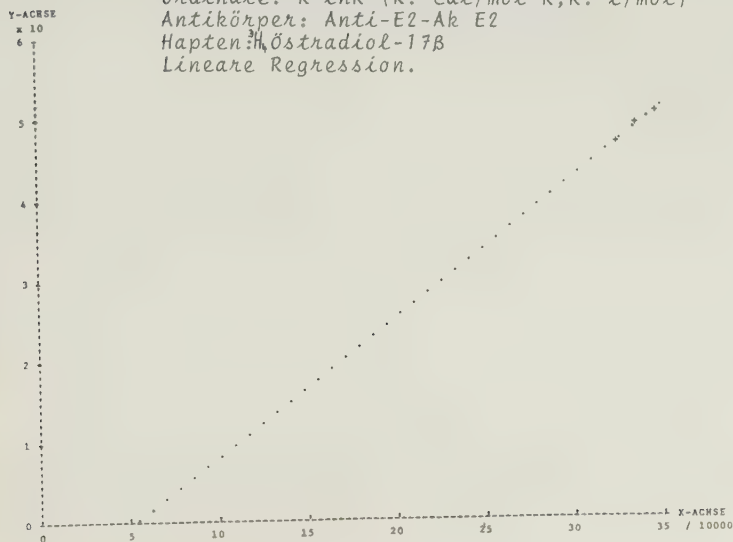


Abb. 6 Dial.Nr.16,17,18

Van't Hoff-Diagramm.

Abszisse: $1/T$ ($T: ^\circ K$)

Ordinate: $R \ln K$ ($R: \text{cal/mol}^0 K; K: \text{l/mol}$)

Hapten: 3H_4 Östradiol-17 β

Lineare Regression

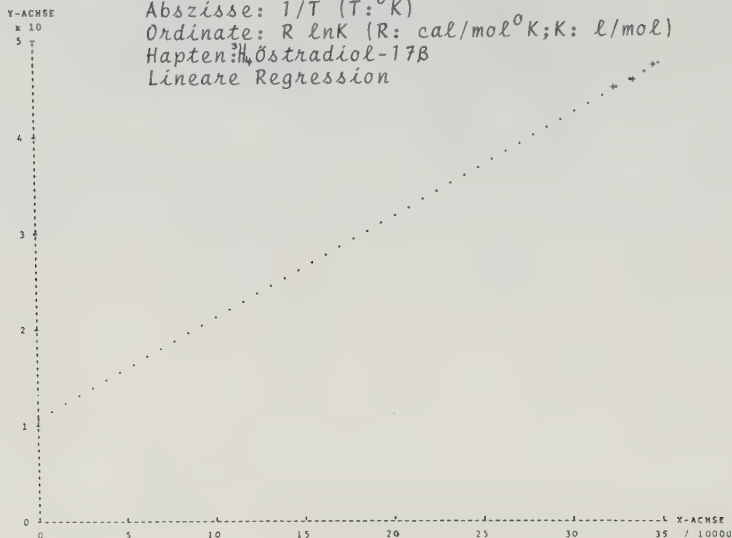


Abb. 7 Dial.Nr.19,20,21

Van't Hoff-Diagramm.

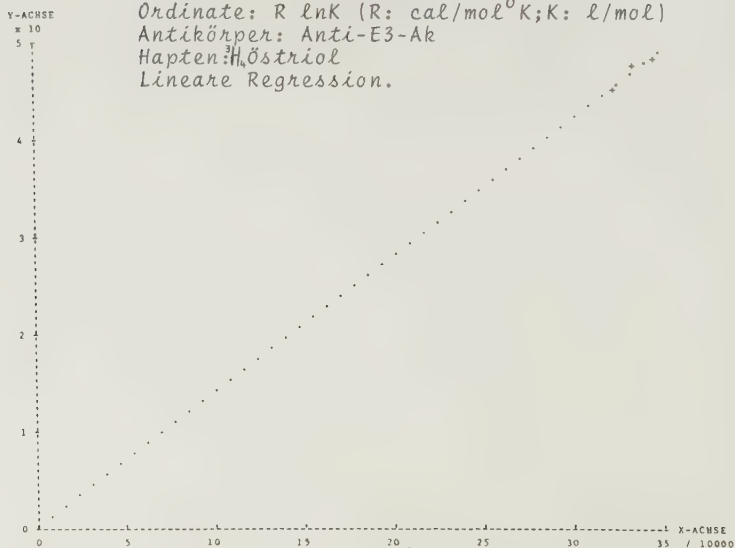
Abszisse: $1/T$ ($T: ^\circ K$)

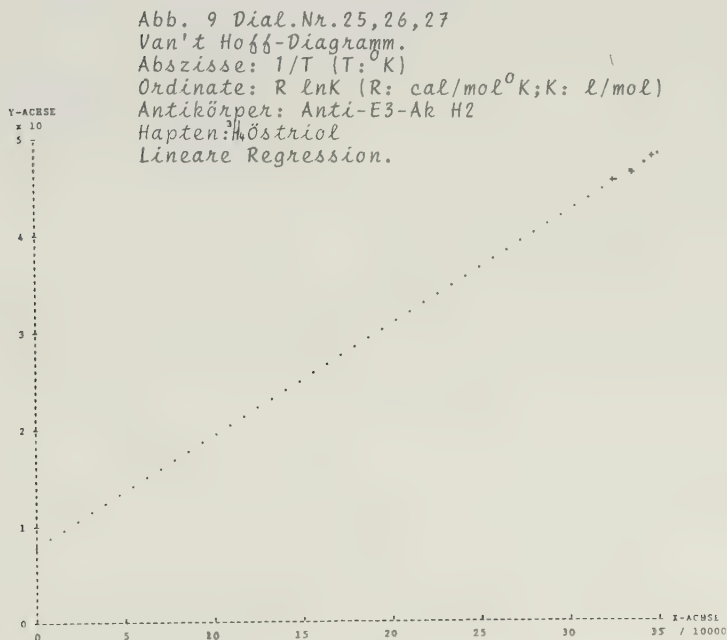
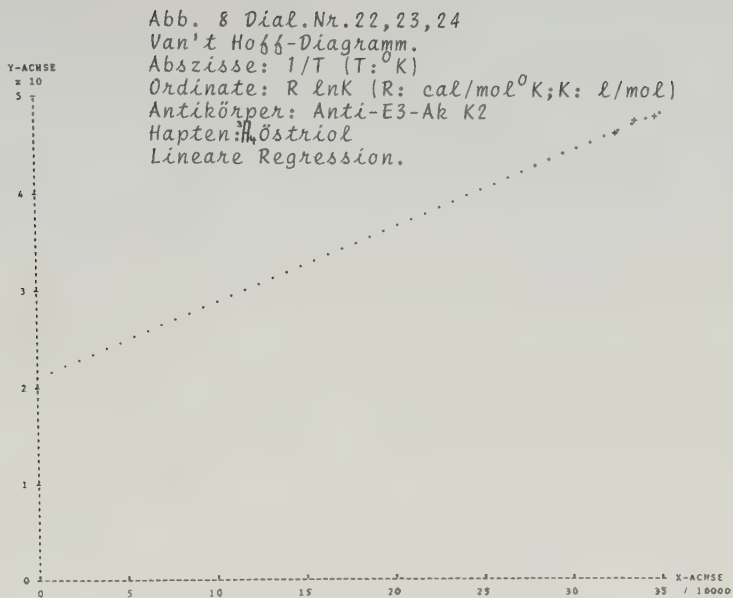
Ordinate: $R \ln K$ ($R: \text{cal/mol}^0 K; K: \text{l/mol}$)

Antikörper: Anti-E3-Ak

Hapten: 3H_4 Östriol

Lineare Regression.





Ich danke Herrn Prof. Dr. Dr. E. Kuss für die Überlassung des Themas und für die Unterstützung bei der Fertigstellung dieser Arbeit.

Herrn Dr. H. Thoma schulde ich Dank für die jederzeit gewährte fachliche Beratung und Betreuung.

Lebenslauf

Ich bin am 22. August 1949 als Sohn des Redakteurs Ulrich Link und seiner Frau Ruth in Stuttgart geboren. Von 1955 bis 1964 besuchte ich die Rudolf-Steiner-Privatschule in München. 1964 wechselte ich auf das Staatliche Rupprecht-Gymnasium in München.

Nach meiner Schulzeit, die ich 1969 mit dem Abitur abschloß, studierte ich drei Semester Rechtswissenschaft und begann im Oktober 1971 mit dem Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München. 1972 bestand ich die naturwissenschaftliche -, 1973 die ärztliche Vorprüfung, beide mit "sehr gut". Die Ergebnisse des ersten und zweiten Abschnittes der ärztlichen Prüfung, 1974 und 1976, lagen beide über dem Durchschnitt.

Zur praktischen Ausbildung im dritten klinischen Studienabschnitt war ich vom 1.10.1976 bis 31.1.1977 im Fach Chirurgie in der Ersten Chirurgischen Abteilung des Lehrkrankenhauses München Schwabing, vom 1.2. bis 31.5.1977 im Fach Augenheilkunde in der Augenklinik der Universität München und vom 1.6. bis 30.9.1977 im Fach Innere Medizin in der II. Medizinischen Klinik der Universität München.

Im Oktober 1977 nahm ich erfolgreich am dritten Abschnitt der ärztlichen Prüfung teil.

